

ROBERTO PAIONE GASPARINI

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA, DOS CARCINOMAS SEBÁCEO,
BASOCELULAR E ESPINOCELULAR UTILIZANDO OS
ANTICORPOS BRST1, EMA, CK8/18 E KI67.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para a obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Odashiro

CAMPO GRANDE
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

ROBERTO PAIONE GASPARINI

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA, DOS CARCINOMAS SEBÁCEO,
BASOCELULAR E ESPINOCELULAR UTILIZANDO OS
ANTICORPOS BRST1, EMA, CK8/18 E KI67.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para a obtenção de título de Mestre.

Resultado_____

Campo Grande (MS), 18 de outubro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Nakao Odashiro

Instituição UFMS

Prof. Dr. Andresson Péricles Figueiredo

Instituição UNIVALI

Prof. Dr. Andrei Borin

Instituição UNIFESP

À minha esposa **Andrea** pelo amor, companheirismo, apoio, incentivo, pela dedicação, paciência e amizade demonstrados ao longo destes anos de convívio.

Aos meus pais, **João e Clais**, os principais responsáveis pela minha formação, pelo amor, carinho, dedicação e incentivo constantes, toda a minha gratidão.

Aos meus filhos **Jady, João Roberto e Rafael** pela alegria e ao aprendizado de vida diário.

Dr. João Argeu de Almeida e Silva pelas lições de medicina e vida, e pela amizade de todos esses anos.

Dr. João Basílio Gasparini, pelo total apoio, criação, dedicação e, sobretudo incentivo às minhas atividades acadêmicas e científicas.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Alexandre Nakao Odashiro**, pelo incentivo, apoio e orientação na realização desta dissertação.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos**, pelo incentivo e orientação na elaboração desta dissertação.

RESUMO

Gasparini RP. Análise imunoistoquímica, dos carcinomas sebáceo, basocelular e espinocelular utilizando os anticorpos BRST1, EMA, CK8/18 e Ki67. Campo Grande; 2010. [Disseretação-Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul]

Introdução:a imunoistoquímica é uma ferramenta eficaz para o diagnóstico diferencial entre os tumores palpebrais malignos mais frequentes: carcinomas basocelular, espinocelular e sebáceo. A presença de antígenos específicos alteram o prognóstico dos pacientes. A elaboração de painéis imunoistoquímicos podem orientar o patologista quanto ao tipo histológico, associação a outros tumores concomitantes, bem como possibilidade de metástases. **Métodos:** foram avaliadas trinta lâminas com características clássicas de tumores de pálpebra, dos arquivos do Laboratório de Análises Clínicas diagnosticados por um patologista. Desses casos dez com diagnóstico de carcinoma sebáceo, dez com diagnóstico de carcinoma basocelular, e dez de carcinoma espinocelular. Foram então submetidos ao painel de análise imunoistoquímica com os seguintes marcadores BRST-1, EMA, CK8/18, Ki67. Foi realizada análise estatística através de testes qualitativos. **Resultados :** O marcador BRST1 apresenta melhor expressão para diagnosticar o carcinoma sebáceo em áreas de diferenciação sebácea e glândula sebácea. Carcinomas basocelular e espinocelular foram melhor corados nas áreas das glândulas sebáceas. O marcador EMA apresenta melhor expressão, para o carcinoma sebáceo em áreas com diferenciação sebácea e glândula sebácea, para o carcinoma basocelular nas áreas das glândulas sebácea e das écrinas. O carcinoma espinocelular foi melhor corado nas áreas com as características clássicas do tumor . O marcador CK8/18 corou o carcinoma sebáceo nas áreas de diferenciação sebácea e nas glândulas écrinas. No carcinoma basocelular nas áreas com características clássicas tumor e glândulas écrinas. No carcinoma espinocelular as áreas com glândula écrina. O marcador Ki67 não apresentou diferença estatisticamente significativa. **Conclusão:** A expressão dos marcadores, nos carcinomas, para cada uma das áreas, revelou diferença estatisticamente significativa para o marcador BRST1 no carcinoma sebáceo na área de diferenciação sebácea. Para o marcador EMA ocorreu diferença estatisticamente significativa no carcinoma espinocelular na área tumor e no carcinoma sebáceo na área de diferenciação sebácea. O marcador CK8-18 teve diferença estatisticamente significativa no carcinoma espinocelular área tumor e carcinoma sebáceo na área de diferenciação sebácea.

Palavras-chave: imunoistoquímica, carcinoma sebáceo, carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular

ABSTRACT

Gasparini RP. Immunohistochemistry of sebaceous carcinoma, basal cell and squamous cell carcinoma using BRST1, EMA, CK8/18 and Ki67.

Background: immunohistochemistry is an useful tool, to differentiate sebaceous carcinoma, basal cell and squamous cell carcinoma. The presence of antibodies always changes the prognosis and distinction between each tumor. Immunohistochemical staining panel using EMA, BRST-1, CK8/18 and Ki67, may help when the light microscopy cannot clearly distinguish these carcinomas. **Methods:** thirty (30) classics lid carcinoma were submitted to antibodies staining, ten (10) classics sebaceous carcinoma, ten (10) classics basal cell carcinoma and ten (10) classics squamous cell carcinoma. BRST-1, EMA, CK8/18, Ki67 were used and the results submitted to qualitative statistical tests. **Results:** BRST-1 shows the best staining in the sebaceous differentiation areas of the sebaceous carcinoma. Basal cell and squamous cell carcinomas are best stained by BRST-1 in sebaceous glands areas. EMA stains sebaceous carcinoma in the sebaceous differentiation areas and in the sebaceous glands. Basal cell carcinoma is stained by EMA in sebaceous glands and in the holocrine glands. Squamous cells carcinoma is stained by EMA only in the classic tumor area. CK8/18 in the sebaceous carcinoma stained areas with sebaceous differentiation and holocrine glands. Basal cell carcinomas stained areas with classic features and holocrine glands, squamous cell carcinoma stained better in holocrine glands. Immunostaining with Ki67 wasn't statistically relevant. **Conclusions:** Immunoistochemical staining is statistically relevant for BRST-1 in the sebaceous differentiation area of the sebaceous carcinoma. EMA is statistically relevant in the sebaceous differentiation area of the sebaceous carcinoma and squamous cell carcinoma in the classics features areas. CK8/18 is statistically relevant in the sebaceous differentiation area of the sebaceous carcinoma and squamous cell carcinoma in the classics features areas.

Key words: immunoistochemistry, sebaceous carcinoma, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Semelhança histopatológica dos carcinomas sebáceos (CS). Campo Grande, 2010	25
Tabela 2 - Aplicação do Teste de Kruskal-Wallis, para cada marcador em cada um dos carcinomas, em todas as áreas tumores com os respectivos valores de p.Campo Grande, 2010	26
Tabela 3- expressão do marcador BRST-1 nos tumores e estruturas cutâneas normais adjacentes aos tumores. Campo Grande, 2010	28
Tabela 4 - Expressão de EMA nos tumores. Campo Grande, 2010.	31
Tabela 5 - Expressão de CK8/18 nos tumores. Campo Grande, 2010	34
Tabela 6 - Expressão do anticorpo de proliferação celular Ki67 todos os tumores, porcentagem das células marcadas por lâmina. Campo Grande, 2010	35
Tabela 7 - Comparação do desempenho (expressão) entre os marcadores, para diagnosticar o CS, na área Dif.seb, com os respectivos valores de p. Campo Grande, 2010.....	37
Tabela 8 - Comparação da expressão entre os anticorpos no CBC, om os respectivos valores de p. Campo Grande, 2010.....	37
Tabela 9 - Comparação do desempenho (expressão) entre os marcadores, para diagnosticar o CEC, na área (tumor) tumor, com os respectivos valores de p.Campo Grande, 2010.....	38
Tabela 10 - Aplicação do teste de Kruskal-Wallis, para estudar a expressão do anticorpo BRST-1 nos CS, CBC e CEC, em cada uma das áreas dos tumores, com os respectivos valores de p. Campo Grande, 2010.....	38
Tabela 11- Aplicação do teste de Kruskal-Wallis, para o estudo da expressão do marcador EMA nos CS, CBC e CEC, em cada uma das áreas dos tumores, com os respectivos valores de p.Campo Grande, 2010.....	39
Tabela 12-Apresentação do valor-p, na comparação dos CS, CBC e CEC através do anticorpo EMA na área tumor. Campo Grande, 2010.....	39
Tabela 13 - Aplicação do Teste de Kruskal-Wallis, para o estudo da expressão do anticorpo CK8/18 nos CS, CBC e CEC, em cada uma das áreas dos tumores, com os respectivos valores de p Campo Grande. 2010.....	40

Tabela 14-Apresentação do valor-p, na comparação dos CS, CBC e CEC através do anticorpo CK8/18 na área do tumor.Campo Grande, 2010.....	40
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lâmina de carcinoma sebáceo com características de carcinoma basocelular.....	25
Figura 2 - Lâmina de carcinoma sebáceo com características de carcinoma espinocelular	26
Figura 3 - Lâmina de carcinoma sebáceo com características de carcinoma basocelular.....	26
Figura 4- Fotomicrografia da imunoistoquímica com BRST-1 do caso carcinoma sebáceo 3.....	29
Figura 5 -Fotomicrografia da imunoistoquímica com BRST-1 do caso carcinoma sebáceo 5.....	29
Figura 6 -Fotomicrografia da imunoistoquímica com BRST-1 do caso carcinoma sebáceo 6.....	29
Figura 7 -Fotomicrografia da imunoistoquímica com BRST-1 do caso carcinoma basocelular.....	30
Figura 8 - Fotomicrografia da imunoistoquímica com BRST-1 do caso carcinoma espinocelular 3.....	30
Figura 9 - Fotomicrografia da imunoistoquímica com EMA no caso carcinoma espinocelular 9.....	32
Figura 10 - Fotomicrografia da imunoistoquímica com EMA no caso carcinoma sebaceo 7.....	32
Figura 11 - Fotomicrografia da imunoistoquímica com CK8/18 do caso carcinoma basocelular 6.....	35
Figura 12- Fotomicrografia da imunoistoquímica com Ki-67 no caso carcinoma sebáceo 8.....	36
Figura 13- Fotomicrografia da imunohistoquímica com MLH1 no caso carcinoma sebáceo 2.....	36
Figura 14- Fotomicrografia da imunoistoquímica com MSH2 do caso carcinoma sebáceo 10.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

BRST1- anticorpo monoclonal contra glicoproteína BCA225

CBC- carcinoma basocelular

CS – carcinoma sebáceo

CEC – carcinoma espinocelular

CK8/18- anticorpo monoclonal contra citoqueratinas 8 e 18

Dif Seb - área tumoral com diferenciação sebácea

EMA – anticorpo monoclonal contra antígeno da membrana epitelial

Epte - eptélio

Gl.Seb- glândula sebácea

Gl.Ecri - glândula écrina

Fol Pilo- folículo piloso

H&E-hematoxilina-eosina

IIQ- imunoistoquímica

Ki67- anticorpo monoclonal contra antígeno Ki67

LAC- Laboratório de Análises Clínicas de Campo Grande

MLH1- anticorpo monoclonal contra gene multL homolog 1

MSH2 – anticorpo monoclonal contra gene multiS homolog 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Imunoistoquímica.....	13
2.2 Carcinoma sebáceo	14
3 OBJETIVOS.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Processamento dos tecidos.....	21
4.2 Processamento imunoistoquímico.....	21
4.3 Análise da imunoistoquímica.....	23
4.4 Análise estatística	24
5 RESULTADOS.....	25
5.1Características histopatológicas	25
5.1.1 Imunoistoquímica das áreas tumorais.....	26
5.1.2Imunoistoquímica com o anticorpo BRST1.....	27
5.1.3Imunoistoquímica com o anticorpo EMA	30
5.1.4Imunoistoquímica com o anticorpo CK8/18.....	33
5.1.5Antígeno Ki67 e marcadores MLH1 e MSH2.....	35
5.2 Estudo sobre o desempenho dos marcadores.....	37
5.2.1 Marcador BRST1.....	38
5.2.2 Marcador EMA.....	39
5.2.3 Marcador CK8/18.....	40
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	47
8 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A imunoistoquímica (IIQ) é uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico histopatológico, principalmente nos casos de lesões duvidosas. As técnicas de IIQ consistem na utilização de anticorpos para revelar a presença de antígenos de interesse em sua célula de origem, na maioria das vezes, utilizando a microscopia óptica para avaliar os resultados. Atualmente, a IIQ é aplicada largamente para fins diagnósticos e de pesquisa segundo Burnier *et al.* (1988).

A literatura é escassa em relação ao carcinoma sebáceo (CS) conforme descrito por Johnson *et al.* (1999) e mais escassa ainda em se tratando da diferenciação IIQ entre os tumores de pálpebra mais freqüentes: carcinomas basocelular (CBC), espinocelular (CEC) e CS.

O CS é uma das neoplasias malignas mais importantes e freqüentes da pálpebra segundo Pereira *et al.* (2005). Esta neoplasia pode exibir comportamento local agressivo e produzir metástases para linfonodos regionais e para órgãos à distância (SHIELDS, 2005). O CS é notoriamente conhecido por simular outros tipos de lesões, devido às suas várias formas de apresentações clínicas e diversos padrões histopatológicos, retardando o seu diagnóstico correto, por meses ou anos e aumentando sua morbidade e mortalidade (CHAO, 2001).

O diagnóstico do CS é um grande desafio para os patologistas, pois a maioria destes tumores simula além de lesões benignas como calázio, hordéolos recorrentes, neoplasias malignas como o CBC e o CEC, tumores cutâneos muito freqüentes em outras regiões da pele (REIFLER, 1986).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Imunoistoquímica

As técnicas para a realização do estudo IIQ consistem na utilização de anticorpos, com características cromáticas específicas, para revelar a presença de antígenos de interesse em sua célula de origem. A maneira utilizada para análise é a microscopia óptica, na maioria dos casos. Atualmente, a IIQ é aplicada largamente para fins diagnósticos e de pesquisa (ALVES, 1998).

A maior parte dos antígenos pesquisados são proteínas. Com a finalidade de preservar a estrutura tridimensional e localização celular dos antígenos, é necessário que o tecido seja fixado apropriadamente e o mais rapidamente possível. O fixador mais utilizado na rotina é a solução tamponada de formaldeído a 10% devido à sua rápida penetração nos tecidos, baixo custo e adequada preservação da grande maioria dos antígenos (MICHALANY, 1998). Além disto, as amostras de tecido são rotineiramente incluídas em blocos de parafina após serem fixadas e esse processo geralmente não tem efeitos adversos sobre a antigenicidade do tecido (WHITE, 1994).

O sistema de detecção IIQ envolve a aplicação do anticorpo primário contra o antígeno de interesse em material adequadamente fixado, incluído em bloco de parafina, seccionado e posteriormente preparado. Como a maioria dos tecidos são incluídos em blocos de parafina e as etapas da reação IIQ ocorrem em soluções aquosas tamponadas, a parafina precisa ser removida com auxílio de xilol e álcool (ALVES, 1998).

No método direto de detecção, para análise de imunofluorescência, o anticorpo primário é marcado com uma substância fluorescente. Não há necessidade de outros anticorpos e o resultado da reação é observado com microscópio de epifluorescência (WHITE, 1994).

No método indireto, o anticorpo primário não é marcado. Um anticorpo secundário dirigido contra a imunoglobulina do animal no qual o anticorpo primário foi produzido (ex.: anticorpo de cabra anti-imunoglobulina de coelho) é empregado. O anticorpo secundário é conjugado a peroxidase de rábano. A enzima peroxidase transforma um cromógeno solúvel, incolor e reduzido em um precipitado colorido e oxidado na presença de peróxido de hidrogênio (ALVES, 1998). Esta reação é restrita ao sítio de ligação antígeno-anticorpo e produz resultado visível ao microscópio óptico, podendo ser marrom ou vermelho

dependendo do cromógeno utilizado, di-aminobenzidina ou amino-etilcarbazol, respectivamente. A atividade da peroxidase endógena, normalmente encontrada nas hemácias e leucócitos presentes no tecido, deve ser bloqueada com peróxido de hidrogênio antes da adição do anticorpo primário conforme descrito por (WHITE, 1994).

No método indireto, duas modalidades podem ser utilizadas, peroxidase-antiperoxidase e complexo streptavidina-biotina. Na modalidade peroxidase-antiperoxidase, são utilizados 3 reagentes principais: o anticorpo primário, o anticorpo secundário e um terceiro anticorpo contra e ligado à peroxidase. Como cada anticorpo possui dois sítios de ligação, esta técnica é bastante sensível devido à amplificação das ligações que ocorrem entre os anticorpos utilizados. Na modalidade do complexo streptavidina-biotina, o anticorpo secundário é conjugado à biotina. A streptavidina é uma glicoproteína que tem afinidade pela biotina superior à afinidade de anticorpos por antígenos. Complexos de moléculas de streptavidina, biotina e peroxidase, que por sua vez se ligam à biotina do anticorpo secundário, são adicionados e amplificam o resultado final (WHITE, 1994).

Em toda técnica IIQ, são utilizados controles positivos e negativos para averiguar a ocorrência de ligações não-específicas. O controle positivo é um espécime que possui reatividade conhecida para um determinado antígeno. O controle negativo é uma secção do mesmo espécime em estudo na qual o anticorpo primário foi omitido, mas todas as outras etapas foram as mesmas. Um terceiro tipo de controle é o controle interno, positivo e/ou negativo, isto é, células presentes no espécime testado que normalmente apresentam coloração positiva ou negativa para o antígeno testado (WHITE, 1994).

A sensibilidade de um sistema de detecção representa a menor quantidade de antígeno que o mesmo é capaz de detectar. Atualmente, as modalidades peroxidase-antiperoxidase e complexo streptavidina-biotina são consideradas as mais sensíveis em virtude da amplificação do sinal resultante que ocorre nas mesmas (WHITE, 1994).

2.2 Carcinoma Sebáceo

O CS é uma neoplasia das glândulas sebáceas (Gl.seb), são associadas aos folículos pilosos, sendo encontradas nas junções da parte inferior do infundíbulo do folículo e istmo. As Gl.seb normais são compostas por ácinos lobulares revestidos por células cubóides e

germinativas. A parte interna das glândulas é composta por células sebáceas maduras, contendo no citoplasma inúmeros vacúolos com secreções lipídicas Shalin *et al.* (2010).

As Gl.seb. são encontradas em grande número na cabeça e região do pescoço e são responsáveis pela produção de sebo nessas áreas e são estruturas sensíveis ao hormônio testosterona segundo Shalin *et al.* (2010). As glândulas sebáceas podem sofrer algumas transformações, com características benignas, as glândulas ectópicas, hiperplasia sebácea, adenoma sebáceo, sebaceoma, e com características malignas o CS (SHALIN, 2010).

O diagnóstico do CS pode ser dificultado por este simular lesões benignas como o calázio e blefarconjuntivite crônica, e os outros tumores de pálpebra freqüentes CBC cerca de 90% das neoplasias malignas e CEC cerca de 4% (SHIELDS, 2005). O CS responde por 5% das neoplasias malignas de pálpebra.

Foram analisados 1060 casos retrospectivamente, com diagnóstico de calázio. As lâminas revisadas mostraram que em doze casos o CS não havia sido detectado, e em três casos o CBC foi confundido com calázio. Casos com características benignas podem mascarar lesões graves malignas e protelar o tratamento adequado (OZDAL, 2004).

Quarenta casos de CS foram estudados e analisados os aspectos clínico-patológicos (DOXANAS; GREEN, 1984). Foi detectado, neste estudo, uma taxa de mortalidade em torno de 18%. Enfatizam como fatores para um melhor prognóstico, o diagnóstico precoce associado à excisão cirúrgica ampla com o auxílio de exame de congelação das margens cirúrgicas. Ainda neste estudo, os autores relatam que o diagnóstico anátomo-patológico foi acertado em somente 22,5% dos casos na avaliação inicial, sendo o CS erroneamente diagnosticado como CBC ou CEC.

Em 2005, uma revisão dos aspectos clínico-patológicos do CS da região ocular foi realizada (SHIELDS, 2005). Estes autores descrevem que esta neoplasia acomete preferencialmente mulheres, após os 50 anos de idade e ocorre mais freqüentemente na pálpebra superior. Enfatizam que o diagnóstico precoce do CS é difícil devido à propriedade desta neoplasia, em estágio inicial, de mimetizar lesões inflamatórias benignas, em particular o calázio, ocasionando, invariavelmente um atraso no diagnóstico e no tratamento e conseqüentemente um pior prognóstico.

Em 2006, nova revisão dos aspectos clínico-patológicos, diagnóstico e tratamento do CS foi realizada Leibovitch *et al.* (2006). Descreveram que aproximadamente 75% dos casos desta neoplasia, ocorrem na região ocular, preferencialmente na glândula de meibomius. Além disso, relataram que, na maioria das vezes, há um atraso médio de 1 a 3 anos no

diagnóstico correto devido à propriedade que esta neoplasia tem de simular clinicamente lesões inflamatórias benignas entre elas doença de Bowen. Os autores ainda discutiram os tipos de gradação e classificação anatomo-patológica para esta neoplasia e a possibilidade do uso de colorações como o Oil-Red-O e o Sudan 4 em tecido a fresco para se detectar a presença de gordura no citoplasma das células tumorais e auxiliar no diagnóstico anátomo-patológico (MUTHUSAMY, 2006).

É descrito, também, casos de associação desta neoplasia com a síndrome de Muir-torre (MTS) e enfatizam a importância de se investigar a possibilidade desta síndrome após o diagnóstico de CS. Ainda nestes estudos, os autores discutiram o tratamento cirúrgico convencional e através da técnica de Mohs e associam a presença de multicentricidade e disseminação pagetóide epitelial pela neoplasia como fatores importantes na recidiva do CS após o uso dessas técnicas de tratamento (LEIBOVITCH, 2006).

Os autores também descreveram nesta revisão que o CS pode ter aspectos histopatológicos semelhantes ao CBC e CEC e relatam que, baseado nos casos reportados na literatura, este tumor foi incorretamente diagnosticado de 39% a 77% dos casos. Ainda neste estudo, os autores descreveram que, apesar da etiologia do carcinoma sebáceo não estar bem estabelecida, há uma relação importante entre radioterapia local prévia devido a outras doenças, como por exemplo, o retinoblastoma e origem do CS em pacientes mais jovens.

Stockl *et al.* (1995) descreveram pela primeira vez um caso de paciente imunossuprimido, devido a tratamento por transplante cardíaco prévio, com CS da pálpebra associado a MTS. Além disso, os autores fizeram uma extensa revisão de literatura dos casos de MTS associados ao acometimento palpebral por CS. Enfatizaram a importância de se investigar a possibilidade desta síndrome em todo paciente com diagnóstico de CS da pálpebra já que, em 41% dos casos, um CS pode ocorrer antes ou simultânea à neoplasia visceral.

Zurcher *et al.* (1998) publicaram uma série de 43 casos de CS, sendo a maioria do sexo feminino, a pálpebra superior mais frequentemente acometida e a média de idade ao diagnóstico de 62 anos. Descreveram as dificuldades no diagnóstico clínico correto e discorrem sobre a importância de se biopsiar lesões de pálpebras mesmo que de aspecto inflamatório que não respondam adequadamente ao tratamento. Descreveram que, nessa série de casos, os tumores que evoluíram com recidiva e/ou metástase e/ou óbito relacionado à neoplasia, possuíam tamanho maior que 10mm. Além disso, os autores comentaram que, ao contrário da literatura, dos casos relacionados ao óbito pela neoplasia, a maioria era localizado

na pálpebra inferior. Os autores também enfatizaram a importância do seguimento clínico contínuo e em curtos intervalos após o tratamento inicial do CS devido a esta neoplasia potencialmente possuir crescimento rápido e comentam sobre a importância de se avaliar, também, a cadeia de linfonodos pré-auricular, submandibular e cervical neste seguimento.

Sinard (1999), relatou em estudo no qual reuniu 11 casos de CS, 16 de CBC e 14 de CEC todos da região ocular. Neste estudo, foi descrito o uso de exame IIQ, para se diferenciar estas três neoplasias, usando-se os seguintes anticorpos BRST-1, CAM 5.2 e EMA. Descreveu que para o BRST-1, 64% dos casos de CS demonstraram, em geral, positividade difusa para este anticorpo, 36% dos casos de CEC foram focalmente positivos e nenhum dos casos de CBC demonstrou positividade para o BRST-1. Para o CAM 5.2, 73% dos casos de CS demonstraram positividade difusa, para este anticorpo. Aproximadamente 44% dos casos de CBC demonstraram positividade, em geral fraca e focal, para este anticorpo. Nenhum dos casos de CEC selecionados foram corados pelo CAM 5.2. Para o EMA, 90% dos casos de CS demonstraram positividade para este anticorpo. Somente um dos casos de CBC foi positivo para este anticorpo. 79% dos casos de CEC selecionados foram positivos para o EMA. O autor então concluiu que esses três marcadores IIQ são úteis para auxiliar no diagnóstico diferencial dessas três neoplasias que ocorrem na região ocular (SINARD, 1999).

Moreno *et al.* (2001) descreveram um caso de paciente masculino, com 43 anos de idade, de raça negra com um CS de localização axilar, medindo 30x20mm e que evoluiu com múltiplas metástases cutâneas e linfonodais e óbito, em, aproximadamente, 6 meses após o diagnóstico e tratamento cirúrgico inicial. Do ponto de vista morfológico, a neoplasia era pouco diferenciada e estava associada a focos de êmbolos neoplásicos intravasculares peritumorais. Os autores descreveram o estudo IIQ neste caso com o uso dos seguintes anticorpos: CAM 5.2, EMA, CEA, CD-15, p53, Ki-67, GCDFP-15, S-100 e vimentina. O CS do presente caso foi positivo na maioria de suas células para CAM 5.2 e EMA e focalmente positivo para o CEA e CD-15. O tumor demonstrou positividade em 10 a 20% das células para o p53 e foi moderado a fortemente positivo para o Ki-67. A neoplasia não demonstrou imuno-positividade para o GCDFP-15, S-100 e a vimentina. Os autores também discorreram sobre os principais diagnósticos diferenciais anátomo-patológicos do carcinoma sebáceo extra-ocular e enfatizaram a importância do uso de anticorpos como o EMA, HMB-45 e S-100 para auxílio no correto diagnóstico.

Snow *et al.* (2002) descreveram uma série de 9 casos de CS primário da região ocular, tratados através da técnica cirúrgica de Mohs e com seguimento clínico de 1 a 14 anos. Cinco

lesões localizavam-se na pálpebra superior e quatro lesões na pálpebra inferior. Do total das lesões, 4 eram recidivantes. Somente 1 dos 9 tumores relatados recidivou. A recidiva se deu após 18 meses do tratamento cirúrgico, sendo que, neste paciente, foi necessário a exenteração orbital. Os autores também descreveram uma extensa revisão da literatura sobre o emprego desta técnica em carcinomas sebáceos da região ocular. Até aquela data foram reportados 49 casos sendo que, somente em 6 (12%) destes casos, houve recidiva da neoplasia. Em 5 dos 6 casos recidivantes foi detectada extensão epitelial pagetóide extensa. Os autores então concluíram que a técnica cirúrgica de Mohs é de grande valia para diminuição do índice de recidiva do carcinoma sebáceo.

Gardetto *et al.* (2002) descreveram um caso de carcinoma sebáceo em paciente de 78 anos de idade com história de antibioticoterapia prévia por 6 semanas devido a nódulo de aspecto inflamatório e localizada na região central da pálpebra direita superior, não responsiva ao tratamento. Descreveu que o paciente se recusou a realizar a biópsia àquela época e que, após 22 meses, houve crescimento da lesão, a qual, após este período, estava medindo, em torno, de 30mm em diâmetro, associada a ulceração e perda de cílios. Descreveram, também, a detecção de linfadenomegalia na região pré-auricular. Só então foi realizada a biópsia e o diagnóstico de CS. Após o diagnóstico, foi realizada a excisão cirúrgica do tumor palpebral e da metástase linfonodal associada a radioterapia local. Foi realizado seguimento clínico de 15 meses e não foi detectada recidiva ou metástase da neoplasia após o tratamento. Além disso, enfatizaram a importância da biópsia de toda a espessura palpebral associada a várias outras biópsias conjuntivais a fim de mapear a lesão. Os autores então concluíram que o diagnóstico do CS normalmente é tardio devido a esta neoplasia simular doenças inflamatórias e alertam que a perda de cílios devido a infiltração tumoral no folículo piloso é um dos sinais importantes no reconhecimento clínico desta neoplasia.

Em 2004, foi descrita uma série de 1060 casos de lesões da região ocular clinicamente diagnosticados como calázio, num período, de aproximadamente, 8 anos Ozdal *et al.* (2004). Do total de casos, 27(2,6%) eram lesões recorrentes. Os autores descreveram que nessa série foram encontrados 15 (1,4%) neoplasias malignas, sendo 12 CS e 3 CBC. Os autores, também, descreveram que outras neoplasias malignas como carcinoma de merkel, melanoma desmoplásico e carcinoma anexial microcístico já foram reportados simulando clinicamente o calázio.

Enfatizaram a propriedade do CS em mimetizar clinicamente lesões inflamatórias como o calázio acarretando em diagnóstico tardio e pior prognóstico. Os autores então

concluíram que todos os casos com diagnóstico clínico de calázio excisados ou drenados cirurgicamente devem ser enviados para exame anátomo-patológico.

Em 2004, foram descritos 14 casos de CS da pálpebra com seguimento clínico pós-exérese, em média, de 57 meses Callahan *et al.* (2004) Dos 14 casos avaliados, 2 (14%) tiveram recidiva mesmo após ressecção cirúrgica com margens amplas e 1 caso (7%) apresentou recidiva local mesmo após tratamento pelo método de MOHS. Os autores concluíram que o tratamento cirúrgico, deve, no mínimo ser de ressecção ampla com avaliação de margens através de exame congelação convencional ou pelo método de MOHS. Os autores também, comentaram que, nos casos de envolvimento da órbita, a exenteração poderia ser realizada devido ao CS ser uma neoplasia agressiva e que a radioterapia pode ser utilizada nos casos em que a cirurgia não seja possível.

Pereira *et al.* (2005) fizeram uma revisão de literatura, além de descreverem os aspectos histopatológicos de 41 casos de CS da pálpebra, demonstrando as dificuldades de se diagnosticar esta neoplasia pela histopatologia. Uma das maiores dificuldades em se diagnosticar histopatologicamente esta neoplasia consiste no fato da maioria dos casos vistos serem pouco diferenciados, além disto, neste estudo, os autores descrevem que em 75% dos casos os aspectos se assemelhavam ao CEC. Nesta revisão, em 30 casos (76,9%) foi detectada a presença de disseminação pagetóide intra-epitelial e a infiltração vascular foi detectada em 3 casos (15%) .

3 OBJETIVOS

- Verificar se o painel imunoistoquímico composto por BRST-1, EMA, CK8/18 e Ki67 é útil para diferenciar CS de CEC e CBC.
- Analisar a expressão imunoistoquímica dos anticorpos MLH1 e MSH2 nos casos de CS para tentativa de identificação da MTS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O arquivo de casos tumores cutâneos do LAC - Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia de Campo Grande, MS, Brasil, diagnosticados entre 1990 e 2007, foram revisados e uma compilação de todos os casos de tumores palpebrais foi selecionada. Os casos do LAC –são tumores provenientes da Sociedade Beneficente de Campo Grande, Santa Casa, MS, Brasil e do Hospital São Julião, Campo Grande, MS, Brasil. Todos os blocos de parafina foram compilados e cortes foram realizados para a confecção da lâmina de IIQ segundo a técnica descrita a seguir.

Os casos selecionados possuíam obrigatoriamente disponibilidade de material. Após a seleção casos de CBC, CEC e de CS, as lâminas foram encaminhadas para o processamento histopatológico adequado, com a metodologia recomendada por Michalany (1998). Os casos selecionados possuíam características histológicas clássicas de cada tipo de tumor, não restando dúvida quanto ao diagnóstico.

4.1 Processamento dos Tecidos

Em geral, os espécimes foram fixados em formol 10% durante 24 horas. Para estudo histopatológico, foram utilizadas as técnicas rotineiras de inclusão em parafina, conforme metodologia recomendada por Michalany (1998). Secções de 4µm de espessura foram realizadas em micrótomo rotatório utilizando-se navalhas descartáveis e colocadas no banho histológico para serem “pescadas”, e posteriormente montadas em lâminas sinalizadas (Surgipath®) e secas durante a noite, a 37°C, ou a 60°C na estufa de secagem por no mínimo 60 minutos para a coloração.

4.2 Processamento Imunoistoquímico

A técnica de IIQ utilizada foi a do complexo streptavidina-biotina Burnier *et al.* (1988); para a pesquisa e localização dos antígenos a serem estudados nos tecidos embebidos em parafina, utilizando-se os anticorpos a seguir:

- EMA – Novocastra, NEWCASTLE, Reino Unido. Diluição 1:40.
- BRST-1 – Signet Laboratories, Dedham, Massachusetts. Diluição 1:40.
- Ki67 – DakoCytomation, M.7240. Diluição 1:75.
- CK8/18 – Becton-Dickinson, San Jose, Califórnia. Diluição 1:20.
- MSH2 - Ab-2; Oncogene, La Jolla, CA, EU. Diluição 1:00.
- MLH1 - PharMingen International, San Diego, CA, EU. Diluição 1:30.

Todos os anticorpos foram aplicados a todos os tumores. Os anticorpos foram mantidos em um refrigerador para conservação da sua validade. O preparo do tecido para a técnica ABC, fosfatase alcalina conjugada foi a seguinte:

- a. Obtenção de cortes de 4 µm de espessura, através de um micrótomo rotatório, com o auxílio do banho histológico e estufa de secagem.
- b. Desparafinização em xilol dentro da capela de exaustão de gases;
- c. Colocação em álcool absoluto dentro da capela de exaustão de gases;
- d. Reidratação em álcool graduado (95%) dentro da capela de exaustão de gases;
- e. Lavagem em tampão (pH 7,6).
- f. Resgate calor-induzido dos epítomos, com imersão em solução de citrato de sódio 10mMol com pH 6,0 e exposição em forno de microondas por 10 minutos Shi (1995).
- g. Banho com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol durante 10 minutos para bloquear a atividade da peroxidase endógena;
- h. Banho de 30 minutos em solução de albumina de soro bovino a 1% em tampão (pH 7,6) para bloquear as ligações não-específicas.
- i. Aplicação do anticorpo primário dentro da capela de exaustão de gases, com suas respectivas titulações, e incubação em câmara úmida (Fisher modelo SH197) a 4⁰C por 18 horas;
- j. Lavagem com solução de tampão (pH 7,6) por 5 minutos, por 2 vezes.
- k. Aplicação do anticorpo biotinilado de coelho contra o anticorpo primário, em diluição de 1:500, seguida de incubação em câmara úmida a 37⁰C por 30 minutos;
- l. Lavagem com solução de tampão (pH 7,6).

- m. Aplicação do complexo avidina-biotina, fosfatase alcalina conjugado em diluição pronta do fabricante (DAKO), seguida de incubação em câmara úmida a 37⁰C por 30 minutos;
 - n. Lavagem com solução de tampão (pH 7,6) por 5 minutos, por 2 vezes.
 - o. Aplicação do cromógeno “fast red” (DAKO) por 30 minutos;
 - p. Lavagem com água por 5 minutos;
 - q. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer (DAKO);
 - r. Lavagem com água;
 - s. Passagem em solução saturada de carbonato de lítio;
 - t. Lavagem com água destilada;
 - u. Montagem de lâminula com meio de faramount (DAKO)
- .

4.3 Análise da imunoistoquímica

As lâminas de IIQ foram avaliadas por um patologista. Os casos foram classificados em negativo (-), fraco positivo (+) e forte positivo (++), locais onde não foram encontradas estruturas ou não testadas (NR). O critério para a diferenciação entre fraco e forte positivo foi a intensidade da resposta, classificada de acordo com o patologista. Para a avaliação foi utilizado o microscópio óptico. Em cada lâmina foi analisado a expressão do anticorpo no tumor, nas áreas de diferenciação sebácea (Dif.seb) nos casos de CS, e em estruturas cutâneas normais como epitélio (epit), Gl.seb, Gl. ecri, folículo piloso (Fol. pilo) e no estroma, quando presentes nas lâminas examinadas.

Os dados foram armazenados em computador onde foi realizada a análise estatística. Foram realizadas fotomicrografias das lâminas coradas pelo hematoxilina-eosina (H&E) e pela IIQ.

4.4 Análise Estatística

O software utilizado na análise estatística foi o SPSS versão 9.0, tendo sido estabelecidas as conclusões estatísticas com nível de confiança de 95%, (valor – $p \leq 0.05$).

Foram aplicados testes de hipóteses de Kruskal – Wallis para comparações múltiplas, este foi o método escolhido para comparação entre os resultados interpretados, devido à inexistência de resultado IIQ numérico.

O teste Dunnet's foi utilizado para identificar possíveis diferenças nos resultados do teste de Hipóteses de Kruskal-Wallis.

5 RESULTADOS

Foram selecionados e analisados dez casos de CS, dez casos de CBC e dez casos de CEC.

5.1 Características Histopatológicas

Dos casos de CS, sete tinham características histológicas que se assemelham a CEC e três a CBC (tabela 1).

Todos os casos de CEC e CBC possuíam características histológicas clássicas dos respectivos tumores.

Tabela 1-Semelhança histopatológica dos carcinomas sebáceos (CS) - 2010

Caso	Semelhança Histopatológica
CS 1	CEC
CS 2	CBC
CS 3	CEC
CS 4	CBC
CS 5	CEC
CS 6	CEC
CS 7	CEC
CS 8	CEC
CS 9	CEC
CS 10	CBC

As fotografias das lâminas exibidas como figuras 1, 2 e 3, identificam estruturas histológicas que assemelham o CS ao CBC e ao CEC.

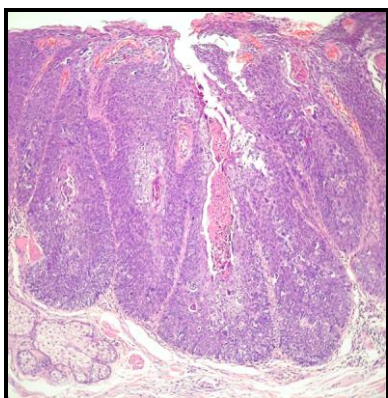


Figura 1: legenda: o tumor apresenta paliçada periférica e basofilia nas células tumorais

Figura 1 - lâmina de carcinoma sebáceo com características de carcinoma basocelular.

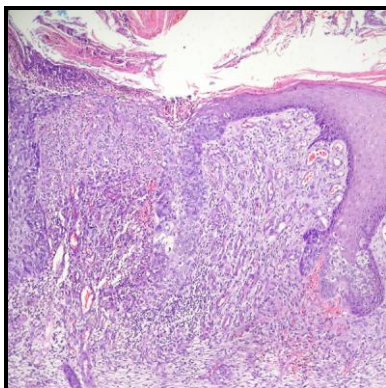


Figura 2: legenda: o tumor apresenta eosinofilia e padrão infiltrativo (H&E, 40x).

Figura 2 - lâmina de carcinoma sebáceo com características de carcinoma espinocelular.

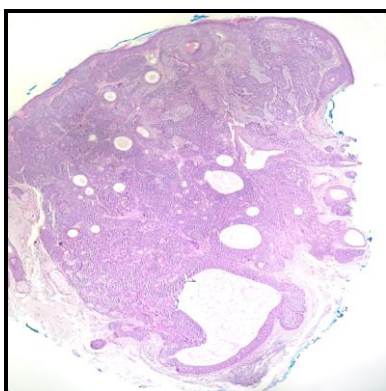


Figura 3: legenda: notam-se espaços cistificados com comedonecrose (H&E, 20x).

Figura 3 – lâmina de carcinoma sebáceo com características de carcinoma basocelular

5.1.1 Imunoistoquímica das áreas tumorais

Considerando os três marcadores BRST-1 ,EMA e CK8–18 nos três carcinomas CS, CBC e CEC foi possível identificar a existência de diferenças estatísticas significativas do desempenho (expressão) de cada marcador em relação à área tumor estudada, conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Aplicação do teste de Kruskal-Wallis, para cada marcador em cada um dos carcinomas, em todas as áreas tumores com os respectivos valores de p - 2010

Tipo de Carcinoma	Marcadores			Resultado
	BRST-1	EMA	CK 8 -18	
CS	p = 0.000	p = 0.000	p = 0.000	significativo
CBC	p = 0.000	p = 0.000	p = 0.000	significativo
CEC	p = 0.000	p = 0.000	p = 0.000	significativo

Diferença significativa quando valor – p $\leq$ 0.05.

Na tabela 2, o teste de Kruskal-Wallis apresentou valores $p = 0.000$, demonstrando que houve diferença significativa no desempenho (expressão) de cada marcador no diagnóstico dos Carcinomas, entre as áreas (tumor).

A seguir foi aplicado o teste de Dunnet's para identificar a(s) área(s) onde existe diferença, isto é, área(s) onde o marcador apresentou melhor desempenho (expressão).

5.1.2 Imunoistoquímica com o anticorpo BRST-1

Nos casos de CS, o anticorpo BRST-1 foi positivo + em 4 casos e foi negativo em 6 casos. Não houve expressão positivo ++ em nenhum dos casos. Porém, este marcador foi positivo em todas as áreas de Dif. seb do tumor, sendo positivo + em 5 casos e positivo ++ nos outros 5 casos. Nas Gl. seb normais, o tumor foi positivo ++ em todos os 7 casos em que elas estavam presentes nas lâminas examinadas (em 3 casos não foi detectada glândula sebácea nas lâminas examinadas). Nas Gl. ecri, este marcador foi positivo em todos os 7 casos em que elas estavam presentes, sendo positivo ++ em 2 casos e positivo + em 5 casos (em 3 casos não foram encontradas Gl. ecri nas lâminas examinadas). Nos epte, Fol.pilo e estromas, este marcador teve expressão negativa em todos os casos, sendo que em 3 casos não foi encontrado folículo piloso nas lâminas examinadas.

Nos casos de CBC, o BRST-1 foi negativo em 100% dos tumores. Porém, foi positivo ++ em todas as Gl. seb de todos os casos, exceto em 1 (caso CBC 5) que foi positivo +. Nas Gl. ecri, ele foi positivo em 7 casos (em 3 casos foi positivo ++ e em 4 casos foi positivo +) e foi negativo em 1 caso. Em 2 casos não foram detectadas Gl. ecri nas lâminas examinadas. Nos epit, fol. pilo e estromas, este marcador foi negativo em todos os casos.

Nos casos de CEC, o BRST-1 foi negativo em 8 tumores e positivo + em 2 tumores. Nas Gl. seb, o tumor foi positivo ++ em todos os 6 casos em que elas estavam presentes nas lâminas examinadas (em 4 casos não foi encontrada glândula sebácea nas lâminas examinadas). Nas Gl. ecri, este marcador foi positivo em todos os 6 casos em que elas estavam presentes, sendo positivo ++ em 2 casos e positivo + em 4 casos (em 4 casos não foram encontradas glândulas écrinas nas lâminas examinadas). Nos epte, Fol. pilo e estromas, este marcador teve expressão negativa em todos os casos, sendo que em 4 casos não foi encontrado Fol. pilo nas lâminas examinadas.

As características da expressão do anticorpo BRST-1 em todos os tumores estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3- expressão do marcador BRST-1 nos tumores e estruturas cutâneas normais adjacentes aos tumores – 2010

Caso	Tumor	Área dif. seb.	Epte	Gl. seb.	Fol. pilo	Gl. ecri	Estroma
CS 1	+	+	-	NR	-	+	-
CS 2	-	+	-	++	-	++	-
CS 3	+	+	-	++	-	+	-
CS 4	-	++	-	++	-	NR	-
CS 5	+	++	-	++	NR	NR	-
CS 6	-	++	-	NR	NR	+	-
CS 7	-	++	-	++	-	+	-
CS 8	-	+	-	++	-	++	-
CS 9	+	++	-	++	-	+	-
CS 10	-	+	-	NR	NR	NR	-
CBC 1	-	NR	-	++	-	NR	-
CBC 2	-	NR	-	++	-	++	-
CBC 3	-	NR	-	++	-	+	-
CBC 4	-	NR	-	++	-	-	-
CBC 5	-	NR	-	+	-	+	-
CBC 6	-	NR	-	++	-	++	-
CBC 7	-	NR	-	++	-	++	-
CBC 8	-	NR	-	++	-	+	-
CBC 9	-	NR	-	++	-	+	-
CBC 10	-	NR	-	++	-	NR	-
CEC 1	-	NR	-	++	-	NR	-
CEC 2	-	NR	-	++	-	+	-
CEC 3	-	NR	-	NR	-	++	-
CEC 4	+	NR	-	++	-	+	-
CEC 5	-	NR	-	++	-	++	-
CEC 6	-	NR	-	++	-	+	-
CEC 7	-	NR	-	NR	-	NR	-
CEC 8	+	NR	-	NR	-	NR	-
CEC 9	-	NR	-	++	-	+	-
CEC 10	-	NR	-	NR	-	NR	-

As fotomicrografias a seguir ilustram como o marcador BRST1 cora o CS figuras 4, 5 e 6 e CBC figura 7 e CEC figura 8.

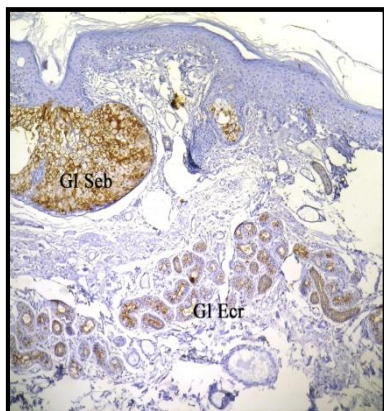


Figura 4: legenda: o caso é positivo ++ em Gl seb e positivo + em Gl ecr normais. Não há tumor representado na presente foto. O epte e estroma são negativos (BRST-1, 40x).

Figura 4 - Fotomicrografia da imunohistoquímica com BRST-1 do caso carcinoma sebáceo 3.

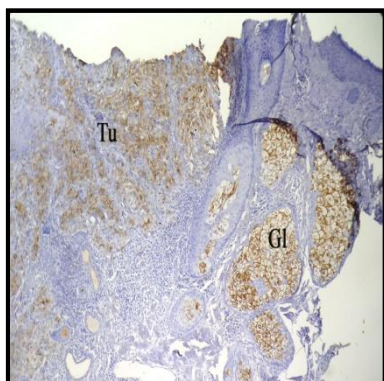


Figura 5: legenda: o tumor geral é positivo + e as Gl seb normais são positivas ++. O epte e o estroma são negativos (BRST-1, 40x).

Figura 5 – Fotomicrografia da imunohistoquímica com BRST-1 do caso carcinoma sebáceo 5.

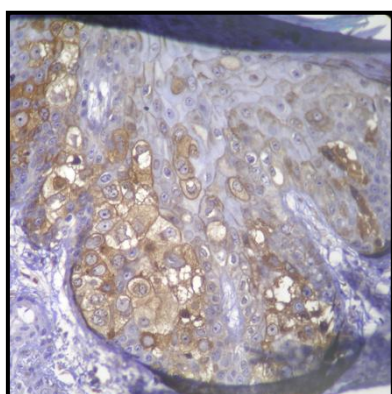


Figura 6: legenda: o caso é positivo ++ na área de Dif. seb intraepitelial (BRST-1, 400x).

Figura 6 – Fotomicrografia da imunohistoquímica com BRST-1 do caso carcinoma sebáceo 6.

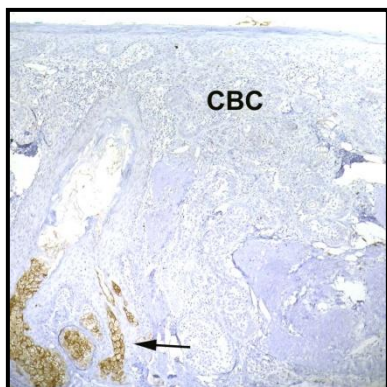


Figura 7: legenda: o tumor (CBC) foi negativo e as Gl. seb foram positivo ++ (seta). O epte e o estroma são negativos (BRST-1 40x).

Figura 7 - Fotomicrografia da imunoistoquímica com BRST-1, caso carcinoma basocelular 1.

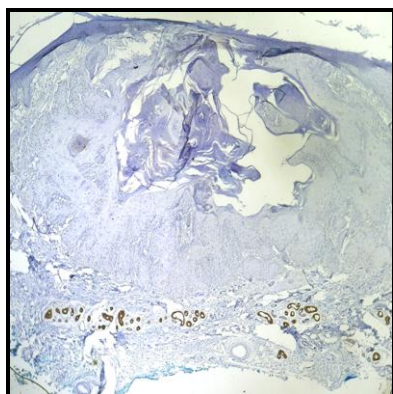


Figura 8: legenda: : o tumor, epte e estroma foram negativos, porém as Gl. ecri foram positivo ++.

Figura 8 – Fotomicrografia da imunoistoquímica com BRST-1 do caso carcinoma espinocelular 3

5.1.3 Imunoistoquímica com o anticorpo EMA

Nos casos de CS, o anticorpo EMA foi positivo + em 4 casos e positivo ++ em 1 caso. Este marcador foi negativo em 5 casos. Nas áreas de Dif. seb do tumor, ele foi positivo em 9 casos, sendo positivo ++ em 4 e positivo + em 5 casos, e foi negativo em 1 caso. Nas Gl. seb normais, o tumor foi positivo ++ em todos os 7 casos em que elas estavam presentes nas lâminas examinadas (em 3 casos não havia Gl. seb nas lâminas examinadas). Nas Gl. ecri, este marcador foi positivo em 6 casos, sendo positivo ++ em 4 e positivo + em 2 casos. Em 3 casos não havia Gl. ecri nas lâminas examinadas e em 1 caso ele foi negativo. No epte ele foi negativo em 9 casos e positivo + em 1 caso. Nos Fol. pilo e estromas, este marcador teve expressão negativa em todos os casos, sendo que em 2 casos não havia Fol. pilo nas lâminas examinadas.

Nos casos de CBC, o EMA foi negativo em 100% dos tumores. Porém, foi positivo ++ em todas as Gl. seb de todos os casos. Nas Gl. ecri, ele foi positivo em todos os 8 casos em que elas estavam presentes, sendo 3 casos positivo ++ e 5 casos positivo +. Em 2 casos não havia Gl. ecri nas lâminas examinadas. No epte ele foi negativo em 9 casos e positivo + em 1 caso. Nos fol. pilo e estromas, esse marcador teve expressão negativa em todos os casos, sendo que em 1 caso não havia fol. pilo na lâmina examinada.

Nos casos de CEC, o EMA foi positivo em 8 casos, sendo positivo + em 6 casos e positivo ++ em 2 casos. Ele foi negativo em 2 casos. Nas Gl. seb, o tumor foi positivo ++ em todos os 6 casos em que elas estavam presentes, sendo que em 4 casos não havia Gl. seb nas lâminas examinadas. Nas Gl. ecri, este marcador foi positivo em todos os 6 casos em que elas estavam presentes, sendo positivo ++ em 3 e positivo + em 3 (em 4 casos não havia Gl. ecri nas lâminas examinadas). No epte ele foi negativo em 8 casos e positivo + em 2 casos. Nos fol. pilo e estromas, este marcador teve expressão negativa em todos os casos, sendo que em 4 casos não havia fol. pilo nas lâminas examinadas.

A imunoexpressão do anticorpo EMA em todos os tumores está representada na tabela 4.

Tabela 4 - Expressão de EMA nos tumores - 2010

Continua							
Caso	Tumor	Área Dif seb	Epte	Gl seb	Fol pilo	Gl. écri	Estroma
CS 1	-	-	+	NR	-	-	-
CS 2	+	+	-	++	-	++	-
CS 3	+	+	-	++	-	++	-
CS 4	-	++	-	++	-	NR	-
CS 5	-	++	-	++	NR	NR	-
CS 6	-	++	-	NR	-	++	-
CS 7	+	++	-	++	-	+	-
CS 8	+	+	-	++	-	++	-
CS 9	++	+	-	++	-	+	-
CS 10	-	+	-	NR	NR	NR	-
CBC 1	-	-	-	++	-	+	-
CBC 2	-	-	-	++	-	NR	-
CBC 3	-	-	-	++	-	+	-
CBC 4	-	-	-	++	-	+	-
CBC 5	-	-	-	++	-	+	-
CBC 6	-	-	+	++	-	++	-
CBC 7	-	-	-	++	-	++	-

Conclusão							
Caso	Tumor	Área Dif seb	Epte	Gl b	Fol pilo	Gl ecri	Estroma
CBC 8	-	-	+	++	-	++	-
CBC 9	-	-	-	++	-	+	-
CBC 10	-	-	-	++	-	NR	-
CEC 1	+	-	+	++	-	-	-
CEC 2	-	-	-	++	-	++	-
CEC 3	++	-	-	-	-	++	-
CEC 4	+	-	-	++	-	+	-
CEC 5	+	-	-	++	-	+	-
CEC 6	+	-	-	++	-	++	-
CEC 7	++	-	-	-	-	-	-
CEC 8	+	-	-	-	-	-	-
CEC 9	+	-	+	++	-	+	-
CEC 10	-	-	-	-	-	-	-

As seguintes fotomicrografias ilustram o padrão que o marcador EMA cora o CEC
figura 9 e o CS figura 10.

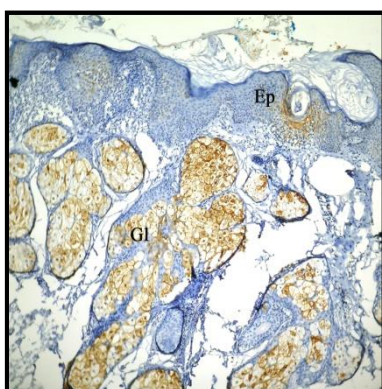


Figura 9: legenda: a reação foi positiva ++ nas Gl seb e positivo + no epitélio. Não há tumor representado na presente figura (EMA 40x).

Figura 9 - Fotomicrografia da imunohistoquímica com EMA no caso carcinoma espinocelular 9

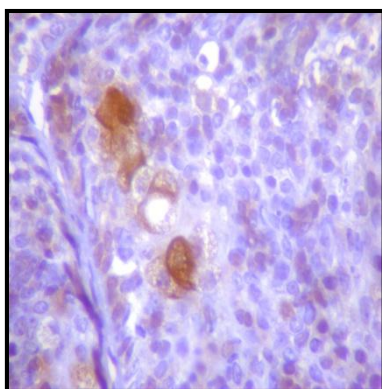


Figura 10: legenda: a reação foi positiva + no tumor e positivo ++ nas áreas de Dif. seb (EMA, 400x).

Figura 10 - Fotomicrografia da imunohistoquímica com EMA no caso carcinoma sebáceo 7.

5.1.4 Imunoistoquímica com o anticorpo CK8/18

Nos casos de CS, o anticorpo CK8/18 foi positivo + em 6 casos e negativo em 4 casos, não havendo casos positivo ++. Nas áreas de Dif. seb do tumor, ele foi positivo + em 8 casos e negativo em 2 casos, não havendo expressão positivo ++. Nas Gl. seb normais, o tumor foi positivo em 6 casos, sendo 5 positivo + e 1 positivo ++. Em 1 caso ele foi negativo e em 3 casos não havia Gl. seb nas lâminas examinadas. Nas Gl. ecri, este marcador foi positivo ++ em todos os 7 casos em que elas estavam presentes (em 3 casos não havia Gl. ecri nas lâminas examinadas). Nos epte, Fol. pilo e estromas, este marcador teve expressão negativa em todos os casos, sendo que em 2 casos não havia Fol.pilo nas lâminas examinadas.

Nos casos de CBC, o CK8/18 foi positivo em 7 casos, sendo 6 positivo + e 1 positivo ++. Em 3 casos ele foi negativo. Nas Gl. seb, ele foi positivo + em 4 casos e negativo em 6, sendo que não houve expressão positivo ++. Nas Gl. ecri, ele foi positivo ++ em todos os 8 casos em que elas estavam presentes, sendo que em 2 casos não havia Gl. ecri nas lâminas examinadas. Nos epte, Fol. pilo e estromas, este marcador teve expressão negativa em todos os casos, sendo que em 1 caso não havia folículo piloso na lâmina examinada.

Nos casos de CEC, o CK8/18 foi positivo + em 1 caso e negativo em 9 outros casos. Nas Gl. seb, o tumor foi positivo + em 4 casos e negativo em 2 casos. Em 4 casos não havia Gl. seb nas lâminas examinadas. Nas Gl. ecri, este marcador foi positivo ++ em todos os 6 casos em que elas estavam presentes, sendo que em 4 casos não havia Gl. ecri nas lâminas examinadas. Nos epte, Fol. pilo e estromas, este marcador teve expressão negativa em todos os casos, sendo que em 3 casos não havia folículo piloso nas lâminas examinadas. A imunoexpressão do anticorpo CK8/18 em todos os tumores está representada na tabela 5.

Tabela 5 - Expressão de CK8/18 nos tumores – 2010

Caso	Tumor	Área dif. seb.	Epit	Gl. seb.	Fol. pilo	Gl. écrina	Estroma
CS 1	+	+	-	NR	-	++	-
CS 2	+	+	-	+	-	++	-
CS 3	+	+	-	++	-	++	-
CS 4	+	+	-	+	-	NR	-
CS 5	-	+	-	+	NR	NR	-
CS 6	-	-	-	NR	-	++	-
CS 7	-	+	-	+	-	++	-
CS 8	+	+	-	+	-	++	-
CS 9	-	-	-	-	-	++	-
CS 10	+	+	-	NR	NR	NR	-
CBC 1	+	NR	-	-	-	++	-
CBC 2	-	NR	-	-	-	NR	-
CBC 3	-	NR	-	-	NR	++	-
CBC 4	+	NR	-	+	-	++	-
CBC 5	+	NR	-	-	-	++	-
CBC 6	++	NR	-	+	-	++	-
CBC 7	-	NR	-	-	-	++	-
CBC 8	+	NR	-	+	-	++	-
CBC 9	+	NR	-	+	-	++	-
CBC 10	+	NR	-	-	-	NR	-
CEC 1	-	NR	-	+	-	NR	-
CEC 2	+	NR	-	+	-	++	-
CEC 3	-	NR	-	NR	NR	++	-
CEC 4	-	NR	-	+	-	++	-
CEC 5	-	NR	-	-	-	++	-
CEC 6	-	NR	-	+	-	++	-
CEC 7	-	NR	-	NR	NR	NR	-
CEC 8	-	NR	-	NR	NR	NR	-
CEC 9	-	NR	-	-	-	++	-
CEC 10	-	NR	-	NR	NR	NR	-

A figura 11 ilustra o marcador CK8/18 corando CBC na área tumor.

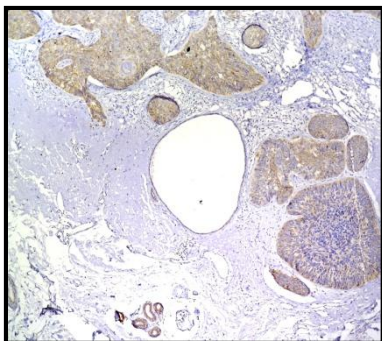


Figura 11: legenda: a reação foi positiva ++ no tumor (CK8/18 40x).

Figura 11 - Fotomicrografia da imunoistoquímica com CK8/18 caso carcinoma basocelular 6:

5.1.5 Antígeno Ki67 e marcadores MLH1 e MSH2

A imunoexpressão do anticorpo de proliferação celular Ki67 variou em todos os tumores. Não houve diferença estatística entre os tumores quanto ao índice de marcação pelo Ki67 (tabela 6).

Todos os tumores foram positivos para os marcadores MLH1 e MSH2, com marcação nuclear.

Tabela 6 - Expressão do anticorpo de proliferação celular Ki67 em todos os tumores, porcentagem das células marcadas por lâmina - 2010

Caso	Ki67	Caso	Ki67	Caso	Ki67
CS 1	10-20%	CBC 1	20-30%	CEC 1	80-90%
CS 2	50-60%	CBC 2	30-40%	CEC 2	50-60%
CS 3	40-50%	CBC 3	60-70%	CEC 3	20-30%
CS 4	20-30%	CBC 4	20-30%	CEC 4	40-50%
CS 5	50-60%	CBC 5	20-30%	CEC 5	30-40%
CS 6	60-70%	CBC 6	60-70%	CEC 6	50-60%
CS 7	20-30%	CBC 7	20-30%	CEC 7	40-50%
CS 8	30-40%	CBC 8	5-10%	CEC 8	40-50%
CS 9	40-50%	CBC 9	20-30%	CEC 9	30-40%
CS 10	30-40%	CBC 10	20-30%	CEC 10	50-60%

As fotomicrografias a seguir ilustram como o antígeno Ki-67 marca o CS na figura 12, o marcador MLH1 em uma lâmina de CS na figura 13, e a fotomicrografia da lâmina marcada com o anticorpo MSH2 em CS.

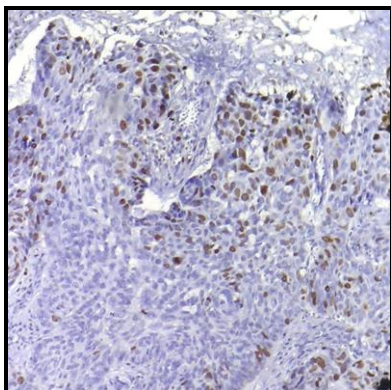


Figura 12: legenda: há cerca de 30-40% de positividade nuclear para este marcador no tumor (Ki67 200x).

Figura 12 - Fotomicrografia da imunoistoquímica com Ki-67 no caso carcinoma sebáceo 8.

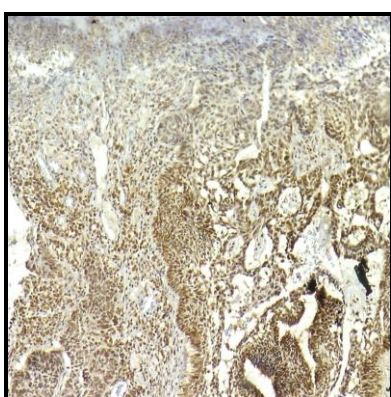


Figura 13: legenda: as células tumorais foram fortemente positivas para este marcador, com padrão nuclear (MLH1 100x).

Figura 13 - Fotomicrografia da imunoistoquímica com MLH1 no caso carcinoma sebáceo 2.

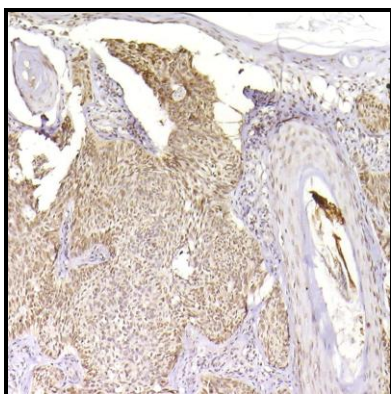


Figura 14: legenda: as células tumorais foram fortemente positivas para este marcador, com padrão nuclear (MSH2 100x).

Figura 14 - Fotomicrografia da imunoistoquímica com MSH2 do caso carcinoma sebáceo 10.

5.2 Estudo sobre o desempenho dos marcadores

Com a finalidade de comparar a expressão entre os marcadores no CS na área de Dif.seb, foi aplicado o teste de Dunnet's, conforme tabela 7, a seguir.

Tabela 7 - Comparação do desempenho (expressão) entre os marcadores, para diagnosticar o CS, na área Dif.seb, com os respectivos valores de p-2010

MARCADORES	Valor-p
BRST-1 x EMA	0.842
BRST -1 x CK8-18	0.013
EMA x CK 8 -18	0.177

Diferença significativa quando valor – p $\leq$ 0.05

A tabela 7 mostra que os dois marcadores BRST- 1 e EMA coram melhor a área de Dif.seb, sendo que o BRST-1 (posto médio = 19.25) leva uma pequena vantagem em relação ao marcador EMA (posto médio = 16.80), apesar da diferença não ser significativa (valor- p = 0.842), mas o EMA não difere do CK8-18 (valor- p = 0.177 e posto médio = 10.40).

Para comparar a expressão entre os anticorpos no CBC, foi aplicado o teste de Dunnet's, conforme Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 - Comparação da expressão entre os anticorpos no CBC, com os respectivos valores de p-2010

MARCADORES	Valor-p
BRST-1 x EMA	-----
BRST -1 x CK8-18	0.009
EMA x CK 8 -18	0.009

Diferença significativa quando valor – p $\leq$ 0.05

A tabela 8 indica que o marcador CK8-18 apresenta melhor expressão no tumor CBC, pois difere dos marcadores BRST-1 e EMA, valor-p = 0.009, e ainda apresenta (posto médio = 22,50) enquanto que os demais apresentaram (posto médio = 12.0), isto é, todos os resultados foram negativos.

Para comparar a expressão entre os anticorpos no CEC, foi aplicado o teste de Dunnet's, conforme Tabela 9 a seguir.

Tabela 9 - Comparação do desempenho (expressão) entre os marcadores, para diagnosticar o CEC, na área (tumor) tumor, com os respectivos valores de p.-2010

Marcadores	Valor-p
BRST-1 x EMA	0.017
BRST -1 x CK8-18	0.907
EMA x CK 8 -18	0.006

Diferença significativa quando valor – $p \leq 0.05$

A Tabela 9, mostra que o anticorpo EMA apresenta expressão significativamente maior no CEC que o BRST-1(valor- $p = 0.017$) e que o CK8-18 (valor- $p = 0.006$) e apresenta melhor desempenho (posto médio = 22,30) que o BRST-1 (posto médio = 12.80) e CK8-18 (posto médio = 11,40). Estes marcadores, por sua vez, não diferem entre si (valor- $p = 0.907$) na expressão no tumor CEC.

Com o objetivo de estudar a expressão de cada um dos anticorpos BRST-1, EMA e CK8-18, nos CS, CBC e CEC para cada uma das áreas nos tumores, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, conforme tabelas a seguir.

5.2.1 Marcador BRST-1

Tabela 10 - Aplicação do teste de Kruskal-Wallis, para estudar a expressão do anticorpo BRST-1 nos CS, CBC e CEC, em cada uma das áreas dos tumores, com os respectivos valores de p-2010

ÁREAS (TUMOR)	CARCINOMAS	
	CS x CBC x CEC	RESULTADO
tumor	0.089	Significativo
Dif. seb	0.000	
Epte	1.000	
Gl. Seb	0.233	
Fol. pilo	1.000	
Gl. ecri	0.842	
Estroma	1.000	

Diferença significativa quando valor – $p \leq 0.05$

A tabela 10, revela que a única área tumor onde existe diferença significativa sobre a detecção dos carcinomas pelo anticorpo BRST-1 é a Dif.seb (valor- $p = 0.000$).

5.2.2 Marcador EMA

Tabela 11- Aplicação do teste de Kruskal-Wallis, para o estudo da expressão do marcador EMA nos CS, CBC e CEC, em cada uma das áreas dos tumores, com os respectivos valores de p.-2010

ÁREAS (TUMOR)	CARCINOMAS	
	CS x CBC x CEC	RESULTADO
tumor	0.002	Significativo
Dif. seb	0.000	Significativo
Epte	0.757	
Gl. seb	0.096	
Fol. pilo	1.000	
Gl. ecri	0.865	
estroma	1.000	

Diferença significativa quando valor – $p \leq 0.05$

A tabela 11, mostra que as áreas dos tumores onde existem diferenças significativas sobre a expressão do anticorpo EMA são tumor (valor- $p = 0.002$) e Dif. seb (valor- $p = 0.00$).

Com a finalidade de identificar o(s) carcinoma(s) onde o anticorpo EMA apresenta melhor expressão nas áreas tumor e Dif. seb foi aplicado o teste de Dunnet's, conforme Tabela 12, a seguir.

Tabela 12-Apresentação do valor-p, na comparação dos CS, CBC e CEC através do anticorpo EMA na área tumor-2010

CARCINOMAS	Valor-p
CS x CBC	0.066
CS x CEC	0.488
CBC x CEC	0.030

Diferença significativa quando valor – $p \leq 0.05$

A tabela 12, mostra o anticorpo EMA, na área tumor, é expresso melhor no CEC (posto médio = 21.10) apesar de não diferir do CS (posto médio = 16.40), enquanto que difere do CBC (valor $p = 0.030$) que apresenta todos diagnósticos negativos (posto médio = 9.0)

Logicamente, o EMA na área Dif. seb é expresso somente no CS já que os outros tumores não apresentam tal área.

5.2.3 Marcador CK8-18

Tabela 13 - Aplicação do Teste de Kruskal-Wallis, para o estudo da expressão do anticorpo CK8/18 nos CS, CBC e CEC, em cada uma das áreas dos tumores, com os respectivos valores de p.-2010

ÁREAS (TUMOR)	CARCINOMAS	
	CS x CBC x CEC	RESULTADO
TUMOR	0.017	Significativo
Dif.seb	0.000	Significativo
Epte	1.000	
Gl. seb	0.484	
Fol. pilo	1.000	
Gl. ecri	0.631	
estroma	1.000	

Diferença significativa quando valor – $p \leq 0.05$

A tabela 13, revela que as áreas do tumor onde existem diferenças significativas sobre a expressão do anticorpo CK8/18 são tumor (valor- $p = 0.017$) e Dif. seb (valor- $p = 0.000$) .

Com a finalidade de identificar o(s) carcinoma(s) nos quais o anticorpo CK8/18 apresenta maior expressão nas áreas do tumor e de Dif. seb foi aplicado o teste de Dunnet's, conforme tabela 14 a seguir.

Tabela 14-Apresentação do valor-p, na comparação dos CS, CBC e CEC através do anticorpo CK8/18 na área do tumor -2010

CARCINOMAS	Valor-p
CS x CBC	0.823

CS x CEC	0.056
CBC x CEC	0.023

Diferença significativa quando valor – $p \leq 0.05$

A tabela 14, mostra o marcador CK8/18, na área do tumor detecta um pouco melhor o CBC (posto médio = 17.20), pois não difere do CS (posto médio = 16.40) enquanto que difere do CEC (valor $p = 0.023$) onde apresenta um posto médio = 9.95.

Logicamente, na área de Dif.seb., este anticorpo foi positivo somente no CS já que os outros tumores não apresentam tal área.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados revelam que a IIQ é uma ferramenta eficaz na diferenciação histopatológica entre os casos de CS, CBC e CEC. O painel IIQ apresentado mostra, através dos resultados obtidos, que ele pode ser utilizado como um padrão para todos os casos de tumores palpebrais suspeitos de CS.

Histopatologicamente, o CS pode ser um desafio para o patologista, pois ele pode apresentar diversos padrões histopatológicos além de simular CBC e CEC conforme descrito por Reifler *et al.* (1986), tumores cutâneos que são muito freqüentes em outros locais do corpo Pereira *et al.* (2005). Apesar disto, os estudos sobre CS são escassos na literatura e muitos dos que existem estão relacionados a fatores prognósticos Rao *et al.* (1982) e Zurcher *et al.* (1998). A dificuldade do patologista para diagnóstico do CS parece variar de caso pra caso. Doxanas *et al.* (1984) estudaram retrospectivamente 40 casos de CS, e evidenciaram que o diagnóstico correto de CS foi realizado pelo primeiro patologista, muitos deles patologistas gerais, em apenas 22.8% dos casos. Porém, Muquit *et al.* (2004) reportaram que o diagnóstico de CS foi realizado corretamente por um patologista ocular experiente em todos os 32 casos estudados. Sendo assim, a IIQ pode ser uma ferramenta de grande utilidade para ajuda no diagnóstico do CS, já que é um tumor incomum, apesar de ser o segundo mais freqüente tumor maligno da pálpebra.

Um dos grandes fatores prognósticos relacionados ao CS é o seu diagnóstico e tratamento precoce (DOXANAS, 1984). Além das dificuldades diagnósticas histopatológicas já relatadas, a literatura descreve o CS como um simulador clínico de lesões inflamatórias (conjuntivite, blefaroconjuntivite, calázio, blefarite, tarsite, etc), o que pode atrasar ainda mais o diagnóstico desta neoplasia Rao *et al.* (1982).

O corante Oil-red-O é tradicionalmente utilizado como o melhor marcador para o diagnóstico de carcinoma sebáceo em casos de congelação. Entretanto por inúmeras razões não é utilizado de rotina. O corante Oil-red-O é utilizado nos cortes de biopsias por congelação, devido ao modo de preparo, pois em lâminas preparadas em bloco de parafina grande parte do conteúdo lipídico dos tecidos é removido. Por isso em muitos casos o diagnostico de carcinoma sebáceo nem é lembrado devido ao preparo em parafina (SINARD, 1999).

Segundo (SHIELDS, 2005), os casos de CS são de diagnóstico difícil pois mimetizam lesões palpebrais benignas. Define o CS como uma neoplasia das Gl. seb que estão presentes em locais com Fol. pilo. São caracterizadas por produzir secreção holócrina, onde as células descamam para o lúmen e secretadas através dos ductos para a pele. Atualmente o termo carcinoma sebáceo é o mais utilizado.

Para Shields *et al.* (2005) o tarso é uma das estruturas que abrigam um grande número de glândulas sebáceas. Aproximadamente 25% dos casos ocorre em região extra-orbital sendo 70% de cabeça e pescoço. De todos os tumores de pele 5-10% ocorrem na pálpebra, sendo 90% CBC, CS 5%, CEC 4%, melanoma maligno 1%.

Existem alguns trabalhos na literatura que estudam possíveis marcadores imunoistoquímicos úteis para ajudar no diagnóstico histopatológico de CS. A maioria dos trabalhos utilizam marcadores isolados ou não comparam com casos de CBC e/ou CEC, (YANG, 2008). Com exceção do trabalho de alguns raros estudos como o realizado por Sramek *et al.* 2008.

O desenvolvimento deste painel imunoistoquímico e utilização destes anticorpos pode ser útil no diagnóstico da MTS, esta síndrome apresenta como características ser autossômica dominante (PONTI, 2005) e apresenta tumores do trato gastro-intestinal, além do CS, adenoma sebáceo e queratoacantoma (RISHI, 2004).

A análise realizada nos tecidos dos marcadores Ki67 e marcadores MLH1 e MSH2 é de extrema importância para a determinação de casos suspeitos para a MTS. Atualmente a MTS é um subgrupo da (HNPCC) de acordo com Stockl *et al.* (1985,). carcinoma colerretal hereditário não polipóide, que é uma síndrome autossômica dominante que predispõe ao aparecimento de neoplasias. Segundo Mathiak *et al.* (2002) foi detectado um gene defeituoso que codifica uma proteína de reparação do DNA, gerando a perda de vários genes alelos. Inicialmente apenas foi descrita a associação com o câncer colerretal, atualmente vários outros tumores são associados à MTS, endométrio, ovário, genitourinário. As proteínas detectadas com as mutações são MLH1 e MSH2 e com frequência menor MSH6, MSH3, MLH3, PMS1 e PMS2.

Em nosso estudo, optamos por utilizar os mesmos marcadores propostos por (SINARD, 1999) pois são os anticorpos utilizados no laboratório de Patologia Ocular da Universidade McGill, Montreal, Canadá. O trabalho de Sinard *et al.* (1999) é um dos únicos na literatura a estudar o anticorpo BRST-1 para o diagnóstico diferencial do CS. Sramek *et al.*, (2008) estudou os mesmos anticorpos utilizados neste estudo e por Sinard *et al.* (1999), porém

ao invés de BRST-1 utilizou o anticorpo Ber-EP4. Os autores deste estudo tentaram importar para o Brasil o anticorpo Ber-EP4 para ser utilizado, porém sem sucesso. Já todos os outros anticorpos utilizados foram obtidos sem dificuldades. Sendo assim, concluímos que o painel proposto neste estudo, além de eficaz, é viável para os patologistas brasileiros.

Os resultados obtidos em nosso estudo com o BRST-1 podem ser comparados aos obtidos por Sinard *et al.* (1999). Naquele estudo, o marcador BRST-1 corou glândulas sebáceas normais, corou fracamente a superfície de ductos écrinos além de corar ocasionalmente a superfície supra-basal do epitélio. Relatam que foi encontrada marcação em 64% dos casos de CS, com padrões variando de difuso a localizado. O presente estudo evidenciou marcação forte em todas as glândulas sebáceas normais. Todos os ductos écrinos também foram positivos, fracos ou fortes, porém não evidenciamos positividade no epitélio escamoso.

Quanto à positividade no CS, observamos que este marcador foi positivo em 40% dos casos quando analisamos o tumor geral. Porém, com uma observação minuciosa, ele foi positivo em 100% nas áreas de evidente diferenciação sebácea do tumor, com marcação variando de fraca a forte.

O BRST-1 foi negativo em todos os casos de CBC, tanto no nosso estudo quanto no trabalho de Sinard *et al.* (1999). Naquele estudo, 36% dos casos de CEC apresentaram positividade focal para o BRST-1, principalmente nos tumores bem diferenciados. No presente estudo não encontramos nenhum caso de CEC que pudesse ser considerado positivo para o BRST-1.

Sramek *et al.* (2008) estudaram o anticorpo CK8/18 em casos de CS, CBC e CEC. Eles observaram positividade para o CK8/18 em todos os casos (100%) de CS, enquanto Sinard *et al.* (1999) observou positividade em 73% dos seus casos de CS. No presente estudo observamos positividade em 60% dos CS no tumor em geral, porém observamos positividade em 80% dos CS nas áreas de diferenciação sebácea. No estudo de Sramek *et al.* (2008), 100% dos casos de CBC também foram positivos para o CK8/18, comparado com 44% dos casos de CBC no trabalho de (SINARD, 1999). Encontramos positividade para o CK8/18 em 70% dos casos de CBC, a grande maioria deles padrão positivo +. A maior diferença encontrada entre os trabalhos publicados foi em relação ao CK8/18 e CEC. Sramek *et al.*, (2008) encontrou positividade em 83.3% dos casos de CEC enquanto (SINARD, 1999) não encontrou positividade com este anticorpo em nenhum dos seus casos de CEC. No presente estudo encontrado positividade em apenas 1 caso (10%) dos casos de CEC, de padrão +.

As diferenças de marcação encontradas na literatura podem ocorrer devido aos diferentes critérios de interpretação dos autores. Sramek *et al.* (2008) consideraram positivos apenas os casos que possuíam marcação forte e difusa, e casos com marcação focal não preenchiam os critérios para positividade segundo aquele autor. Já (SINARD, 1999) considerou e classificou a positividade como focal e fraca. Nós consideramos os casos como positivos quando não havia dúvidas quanto à marcação, além de observar o local/estrutura onde a marcação estava ocorrendo. Assim, salientamos a necessidade da correta interpretação do estudo imunoistoquímico para evitar possíveis erros de análise. No nosso estudo os casos de CS foram positivos para o BRST-1 em 40% dos tumores porém nas áreas com Gl. seb e Gl. écri 100% apresentou positividade desse marcador. Os casos de CBC não foram impregnados por este marcador exceto nas áreas com Gl. seb e Gl. écri.

Os casos de CEC apresentaram impregnação em 20% dos tumores, com positividade em áreas com Gl. seb e Gl. écri.

No estudo realizado por Sinard *et al.* (1999) o anticorpo EMA, que cora a superfície apical das Gl. écri e ductos, e superfície apical das Gl. seb, não apresentou positividade em apenas um caso de CS. De todos os casos de CBC, apenas um foi positivo para o EMA e restrito a áreas com padrão sebáceo. Os casos de CEC apresentaram positividade para EMA em 79% dos casos e também áreas com padrão sebáceo.

No estudo de Shalin *et al.* (2010) o anticorpo EMA foi positivo para células sebáceas maduras, e esse estudo cita ainda a possibilidade de utilização de marcadores para receptores de testosterona para determinar áreas de diferenciação sebácea. Neste estudo a utilização do anticorpo EMA e do Ber-EP4 foi importante para a diferenciação entre CS e CBC. O EMA positivo nos casos de CS e o Ber-EP4 positivo nos casos de CBC tipo nodular. Foram utilizados os marcadores podoplanina (D2-40) positivo em lesões sebáceas (sebaceoma) e focalmente positivo em CBC, e o CK 19 onde o CBC é positivo difusamente e nos casos de CS é positivo focal.

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, o anticorpo EMA testado nos casos de CS apresentou positividade em 50% dos tumores. Em relação ao anticorpo CK8/18, nos casos de CS apresentou 60% de positividade na área tumoral, enquanto CEC apresentou 10% e 70% nos casos de CBC.

Frente aos resultados da análise IIQ e levando em consideração que mesmo nos casos onde foi realizada a retirada da lesão o CS não foi diagnosticado, ou melhor foi erroneamente taxado como CBC em 27,5% das biopsias ou CEC em 25% das amostras (DOXANAS, 1982)

fica comprovado que lesões palpebrais suspeitas devem ser obrigatoriamente analisadas por um patologista experiente e submetidas a análise IIQ, para um diagnóstico e tratamento precoces.

O estudo realizado por Izumi *et al.* (2008), revelou que o marcador Ki67, é muito útil para detectar áreas com proliferação celular intensa, dos casos trinta casos de CS deste estudo vinte e oito casos foram ++ e dois foram +. Em nosso estudo o marcador Ki67 também marcou áreas de proliferação celular, porém sem diferenças estatisticamente significativa entre os tumores. Não é útil para a diferenciação proposta para o nosso painel.

Em relação aos marcadores MLH1 e MSH2, no estudo realizado por Demirci *et al.* (2007), entre os dois casos de MTS descritos um foi positivo para o MSH2, e em outro estudo utilizando os mesmos marcadores, realizado por Izumi *et al.* (2008) todos os casos de CS foram negativos para o MLH1 e MSH2. No nosso estudo após a análise estatística não foram detectadas diferenças entre os tumores.

7 CONCLUSÃO

Com base nos estudos efetuados sobre os marcadores, considerando cada um dos carcinomas e todas as áreas, conclui-se que o marcador BRST1 apresentou diferença estatisticamente significativa no CS na área Dif.seb. Para o marcador EMA apresentou diferença estatisticamente significativa no CEC na área tumor e no CS na área Dif.seb. O marcador CK8/18 teve diferença estatisticamente significativa no CEC área tumor e CS na área Dif.seb.

O marcador Ki-67 corou todas as áreas com proliferação celular, não obtendo resultado estatisticamente significativo.

Os marcadores MLH1 e MSH2 não apresentaram resultados estatisticamente significativos.

REFERÊNCIAS

Alves VAF. Imuno-histoquímica. In: Michalany J (Ed.). Técnica histológica em anatomia patológica. 3 ed. São Paulo: Michalany; 1998. p. 190-200.

Burnier Júnior MNN, Neves RA, Pereira MG, Alberti VN, Rigueiro M. Aplicações da técnica de imunoperoxidase em patologia. Arq Inst Penido Burnier.1988;30(1):46-9.

Callahan EF, Appert DL, Roenigk RK, Bartley GB. Sebaceous carcinoma of the eyelid: a review of 14 cases. Dermatol Surg. 2004; 30(8): 1164-8.

Chao AN, Shields CL, Krema H, Shields JA. Outcome of patients with periocular sebaceous gland carcinoma with and without conjunctival intraepithelial invasion. Ophthalmology. 2001; 108(10):1877-83.

Demirci H, Nelson CC, Shields CL, Eagle RC, Jr., Shields JA. Eyelid sebaceous carcinoma associated with Muir-Torre syndrome in two cases. Ophthal Plast Reconstr Surg. 2007; 23(1):77-9.

Doxanas MT, Green WR. Sebaceous gland carcinoma. Review of 40 cases. Arch Ophthalmol. 1984; 102(2):245-9.

Fan YS, Carr RA, Sanders DS, Smith AP, Lazar AJ, Calonje E. Characteristic Ber-EP4 and EMA expression in sebaceoma is immunohistochemically distinct from basal cell carcinoma. Histopathology. 2007; 51(1):80-6.

Gardetto A, Rainer C, Ensinger C, Baldissera I, Piza-Katzer H. Sebaceous carcinoma of the eyelid: a rarity worth considering. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86(2): 243–244.

Izumi M, Mukai K, Nagai T, Matsubayashi J, Iwaya K, Chiu CS, Goto H. Sebaceous carcinoma of the eyelids: thirty cases from Japan. *Pathol Int*. 2008; 58(8):483-8.

Johnson JS, Lee JA, Cotton DW, Lee WR, Parsons MA. Dimorphic immunohistochemical staining in ocular sebaceous neoplasms: a useful diagnostic aid. *Eye*. 1999; 13 (Pt 1):104-8.

Leibovitch I, Selva D, Huilgol S, Davis G, Dodd T, James C L. Intraepithelial sebaceous carcinoma of the eyelid misdiagnosed as Bowen's disease. *J Cutan Pathol*. 2006; 33(4):303-8.

Mathiak M, Rutten A, Mangold E, Fischer HP, Ruzicka T, Friedl W. Loss of DNA mismatch repair proteins in skin tumors from patients with Muir-Torre syndrome and MSH2 or MLH1 germline mutations: establishment of immunohistochemical analysis as a screening test. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26(3):338-43.

Michalany J. Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo: Michalany, 1998. xvi, 295 p. p.

Miyagawa M, Hayasaka S, Nagaoka S, Mihara M. Sebaceous gland carcinoma of the eyelid presenting as a conjunctival papilloma. *Ophthalmologica*. 1994; 208(1):46-8.

Moreno C, Jacyk WK, Judd MJ, Requena L. Highly aggressive extraocular sebaceous carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 2001; 23(5): 450-5

Muqit MM, Roberts F, Lee WR, Kemp E. Improved survival rates in sebaceous carcinoma of the eyelid. *Eye (Lond)*. 2004; 18(1): 49-53.

Muthusamy K, Halbert G, Roberts F. Immunohistochemical staining for adipophilin, perilipin and TIP47. *J Clin Pathol*. 2006; 59(11):1166-70.

Ozdal PC, Codere F, Callejo S, Caissie AL, Burnier Junior MN. Accuracy of the clinical diagnosis of chalazion. *Eye*. 2004; 18(2):135-8.

Pereira PR, Odashiro AN, Rodrigues-Reyes AA, Correa ZM, de Souza Filho JP, Burnier Junior MN. Histopathological review of sebaceous carcinoma of the eyelid. *J Cutan Pathol*. 2005;32(7):496-501.

Perlman E, McMahon RT. Sebaceous gland carcinoma of the eyelid. *Am J Ophthalmol*. 1978;86(5):699-703.

Ponti G, Losi L, Di Gregorio C, Roncucci L, Pedroni M, Scarselli A. Identification of Muir-Torre syndrome among patients with sebaceous tumors and keratoacanthomas: role of clinical features, microsatellite instability, and immunohistochemistry. *Cancer*. 2005; 103(5):1018-25.

Ponti G, Ponz de Leon M. Muir-Torre syndrome. *Lancet Oncol* 2005;6(12):980-7.

Reifler DM, Hornblass A. Squamous cell carcinoma of the eyelid. *Surv Ophthalmol* 1986; 30(6):349-65.

Rishi K, Font RL. Sebaceous gland tumors of the eyelids and conjunctiva in the Muir-Torre syndrome: a clinicopathologic study of five cases and literature review. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2004; 20(1):31-6.

Shalin CS, Lyle S, Calonje E, Lazar AJF. Sebaceous neoplasia and the Muir-Torre syndrome: important connections with clinical implications. *Histopathology*. 2010; 56,133-147.

Shi SR, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem*. 1995; 43(2):193-201.

Shields CL, Shields JA, Carvalho C, Rundle P, Smith AF. Conjunctival lymphoid tumors: clinical analysis of 117 cases and relationship to systemic lymphoma. *Ophthalmology*. 2001;108(5):979-84.

Shields JA, Demirci H, Marr BP, Eagle Junior RC, Jr., Shields CL. Sebaceous carcinoma of the ocular region: a review. *Surv Ophthalmol*. 2005;50(2):103-22.

Sinard JH. Immunohistochemical distinction of ocular sebaceous carcinoma from basal cell and squamous cell carcinoma. *Arch Ophthalmol*. 1999; 117 (6):776-83.

Snow SN, Larson PO, Lucarelli MJ, Lemke BN, Madjar DD. Sebaceous carcinoma of the eyelids treated by mohs micrographic surgery: report of nine cases with review of the literature. *Dermatol Surg*. 2002; 28 (7): 623-31

Sramek B, Lisle A, Loy T. Immunohistochemistry in ocular carcinomas. *J Cutan Pathol*. 2008 Jul; 35(7):641-6. istochemistry. In: Albert D M, Jakobiec F A (Ed.). *Principles and practice of ophthalmology: clinical practice*. Philadelphia: Saunders. 1994. v. 4, p. 2372-85.

Yang HM, Cabral E, Dadras SS, Cassarino DS Immunohistochemical expression of D2-40 in benign and malignant sebaceous tumors and comparison to basal and squamous cell carcinomas.. *Am J Dermatopathol*. 2008; 30(6):549-54.

Zurcher M, Hintschich CR, Garner A, Bunce C, Collin JR. Sebaceous carcinoma of the eyelid: a clinicopathological study. *Br J Ophthalmol*.1998; 82(9): 1049-55