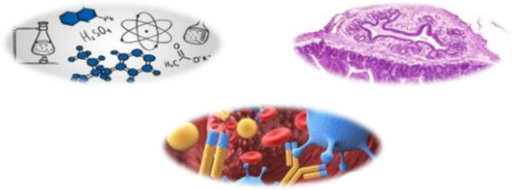
Diagnóstico imuno-histoquímico e molecular (*ISH* e *PARR*) em Oncologia

Fabrizio Grandi
Méd. Vet. (FMVZ, USP)
Residência em Anatomia Patológica (FMVZ, UNESP, Campus Botucatu)
Mestre e Doutor em Patologia (Faculdade de Medicina da UNESP, Campus Botucatu)
Ex-diretor Científico – Associação Brasileira de Patologia Veterinária (ABPV)
CEO Vetschool São Paulo e Dermacare Vet
Telepathology consultant – EUA, Rússia e Europa
www.patologiadrgrandi.com.br

fgrandivet@gmail.com
www.patologiadrgrandi.com.br

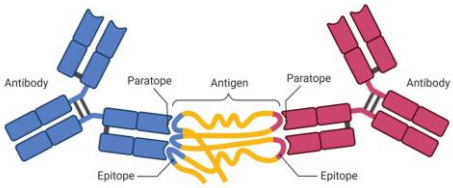
3 **Immunohistochemistry: Fundamentals and Applications in Oncology**

José A. Ramos-Vara[1] and Luke B. Borst[2]
[1]Purdue University, USA
[2]North Carolina State University, USA



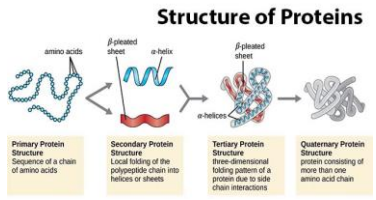
There is no IHC marker that makes the diagnosis by itself. Exceptions always occur, and unfortunately, they tend to merge when IHC is necessary the most (Basturk *et al.*)

Fundamentos

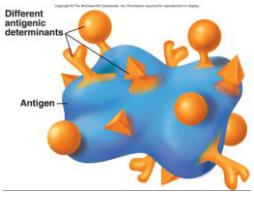


Machine Learning Techniques for the Prediction of B-Cell and T-Cell Epitopes as Potential Vaccine Targets with a Specific Focus on SARS-CoV-2 Pathogen: A Review

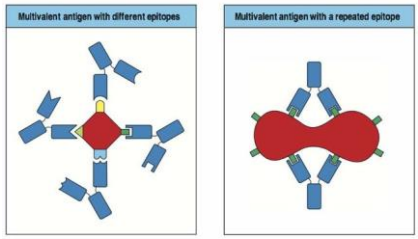
Estrutura protéica



Antígenos e epítopos



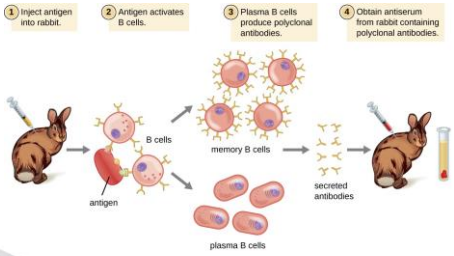
Antígenos multivalentes: heteropoliméricos e homopoliméricos



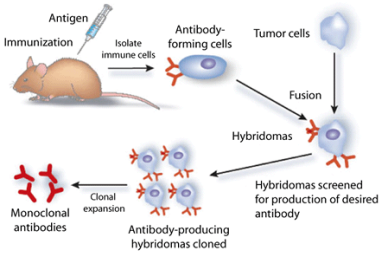
Quais fatores influenciam na qualidade do anticorpo para IHQ?

- **Afinidade molecular**
  - É a habilidade do anticorpo primário em se ligar especificamente a um epítopo do antígeno alvo.
  - Situação ideal seria um anticorpo que reconhecesse apenas um antígeno em apenas tumores de um tipo celular.
    - Ex. MUM1 (MUltiple Myeloma 1)
      - Cães: mieloma múltiplo e plasmocitoma
        Humano: MM, melanomas, leucemias
  - Consequências práticas da alta afinidade
    - Menor tempo de incubação com o tecido-alvo
    - Menor concentração necessária

Anticorpos policlonais



Anticorpos monoclonais



Indicações

- Diagnóstico
- Prognóstico
- Determinação de malignidade (maligno x benigno)

Quais são os fatores determinantes que influenciam os resultados de uma reação imuno-histoquímica?

Fase pré-analítica

1) Fixação do material
   - Fixador não coagulante (formaldeído a 10%)
     - Promove ligações cruzadas entre proteínas
     - Preserva bem: peptídeos, organelas e ácidos nucléicos
     - Preserva minimamente: carboidratos
     - Preservação relativa: lipídeos (adição de cálcio)
     - Vantagens: barato, usado no processamento convencional (H&E) e IHQ

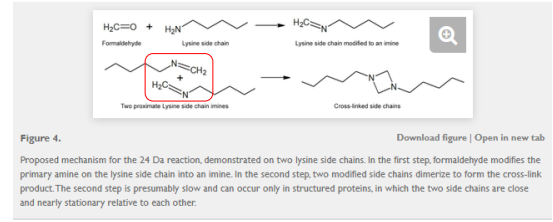


Figure 4. Download figure | Open in new tab

Proposed mechanism for the 24 Da reaction, demonstrated on two lysine side chains. In the first step, formaldehyde modifies the primary amine on the lysine side chain into an imine. In the second step, two modified side chains dimerize to form the cross-link product. The second step is presumably slow and can occur only in structured proteins, in which the two side chains are close and nearly stationary relative to each other.

Mass spectrometry reveals the chemistry of formaldehyde cross-linking in structured proteins

Tamar Tayri-Wilk, Moriya Slavin, Joanna Zamel, Ayelet Blass, Shon Cohen, Alex Motzik, Xue Sun, Deborah E. Shalev, Oren Ram, Nir Kalisman

doi: https://doi.org/10.1101/820779

1) Fixação do material
   - 3 etapas
     - Penetração, ligação covalente e ligação cruzada
       - Ex. peça cirúrgica com 3 mm de espessura
         - 8 horas: 100% de penetração, 24% de ligação covalente e 6% de ligações cruzadas
         - 24 horas: 70% de ligação covalente e 36% de ligação cruzada
         - 24-48 horas: tempo ideal (2-4 mm de espessura)

Fase pré-analítica

1) Fixação do material
   - Espessura: 2-4 mm (máximo)
   - Temperatura de fixação: ambiente (25º C) ou 37º C

Fixação excessiva

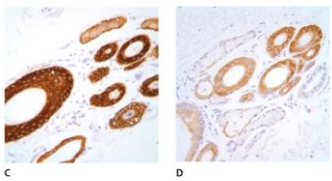


Figure 3.2 Effects of fixation on antigen expression. Antigens are affected by fixation differently. (A,B) Horse, fetus lung infected with *Bartonella* sp. (A) Fixation for 2 days: antigen (arrowheads) is easily detected. (B) Fixation for 11 weeks: Antigen detection is lost. (C,D) Dog, skin. Cytokeratins. (C) Fixation for 2 days: Strong detection in adnexal structures. (D) Fixation for 7 weeks: Significant loss of immunoreactivity. Immunoperoxidase-DAB. (Source: Ramos-Vara and Miller, 2014. Reproduced with permission of SAGE Publications.)

Fixação atrasada
- Autólise
- Difusão de proteínas solúveis

Fixação inadequada

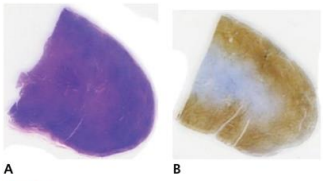


Figure 3.3 Effects of inadequate fixation. Dog, lymph node. Diffuse large B cell lymphoma. This sample was submitted without slicing, resulting in incomplete penetration of fixative and inadequate staining. (A) Reduced staining with hematoxylin in the center of the sample. (B) Lack of staining for CD79a in the center of the sample. Immunoperoxidase-DAB. (Source: Ramos-Vara and Miller, 2014. Reproduced with permission of SAGE Publications.)

1) Fixação do material

- Descalcificação
  - Agentes descalcificantes fracos (ácido fórmico): ideal
  - Agentes descalcificantes fortes: contra-indicado
  - Sempre avisar o laboratório terceirizado!

2) Processamento do material

- Agentes desidratantes e coagulantes usados no processamento > alteração na estrutura terciária

3) Blocos de parafina

3) Blocos de parafina

Fase analítica

1) Recuperação antigênica

- Enzimática
  - Método antigo (até 1990)
  - Proteinase K, tripsina, pronase, pepsina
  - Desvantagens > vantagens

1) Recuperação antigênica
- Induzida por calor
- Tampão citrato, EDTA

1) Recuperação antigênica
- Conceito

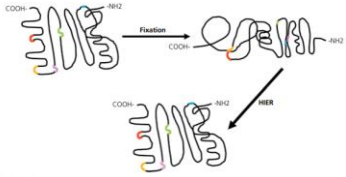


Figure 2.1 Effects of formalin fixation on proteins. Formalin fixation produces conformational changes in proteins secondary to cross-links between protein groups and the fixative. The use of antigen retrieval (heat-induced epitope retrieval, HIER) is intended to revert those changes. (Source: Ramos-Vara and Miller, 2014. Reproduced with permission of SAGE Publications.)

2) Reação antígeno: anticorpo e visualização
- Esquematizar no quadro branco
- Tecido> antígeno>epítopo
- Anticorpo primário
- Anticorpo secundário
- Cromógenos/fluoróforos
- Sistema de detecção (biotina, polímero)

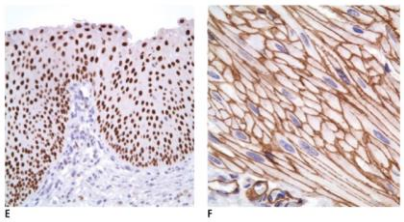
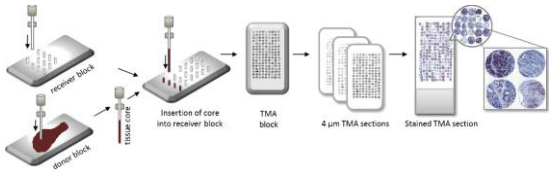


Figure 2.8 Each antigen has a different tissue distribution. (A) Dog, urinary bladder. Cytokeratins have a cytoplasmic localization. (B) Dog, oral melanoma. RACK1 is expressed in the cytoplasm of neoplastic cells. (C) Dog, urinary bladder urothelial carcinoma. A distinct membranous and less intense cytoplasmic expression for uroplakin III is observed in numerous neoplastic cells. (D) Dog, liver. Arginase-A is expressed in both the nucleus and cytoplasm. (E) Dog, urinary bladder urothelial carcinoma. Most urothelial cells have nuclear expression of GATA-3. (F) Dog, smooth muscle. Collagen IV is expressed in the interstitium. Immunoperoxidase-DAB.

Fase pós-analítica

Controles da reação
- Tecidual positivo
  - Mesma espécie do tecido teste
  - Na mesma lâmina
  - Quantidade de antígeno variável (discreta>moderada>acentuada)
  - Controle externo ou interno
- Tecidual negativo

Controles da reação
- Reagente negativo
  - Diluente de anticorpo
  - Imunoglobulina espécie-específica não imune
  - Anticorpo irrelevante
  - Tampão



Relatório imuno-histoquímico

- Localização do antígeno (citoplasmático, membrana ou nuclear)
- Intensidade da reação (+++, ++, +, +/-)
- Distribuição no tecido
- Percentual de marcação
- Ex. MUM1, Vimentina, c-kit
- Conheça os padrões!

Interpretação dos resultados

- Os controles foram validados?
- Existe ponto de corte para o marcador?
- Existem publicações validando o painel?
- Qual percentual de células marcadas é considerado positivo?

Interpretação dos resultados

- Controle e teste NEGATIVOS
- Controle POSITIVO, teste NEGATIVO
- Controle POSITIVO, teste PARCIALMENTE POSITIVO

Interpretação dos resultados

- *Background* ou fundo

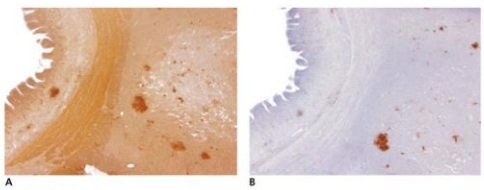


Figure 3.15 Background due to primary antibody concentration. Cat, intestine. B cell lymphoma. (A) The antibody titer was too concentrated, producing diffuse nonspecific background. (B) Optimal dilution showing specific labeling only in areas with T lymphocytes. CD3 immunoperoxidase-DAB.

Overview

Product name	Anti-CD3 antibody [F7.2.38] See all CD3 primary antibodies
Description	Mouse monoclonal [F7.2.38] to CD3
Host species	Mouse
Tested applications	**Suitable for:** IHC-P, IHC-FoFr ▸more details
Species reactivity	**Reacts with:** Human
Immunogen	Full length native protein (purified) (Human).
Positive control	Tonsil.
General notes	This antibody labels CD3 epsilon and is a useful tool for the identification of T cells and related neoplasms

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Shipped at 4°C. Store at +4°C short term (1-2 weeks). Store at -20°C or -80°C. Avoid freeze / thaw cycle.
Storage buffer	Preservative: 0.05% Sodium Azide Constituents: 1% BSA, Tissue culture supernatant
Purity	Tissue culture supernatant
Primary antibody notes	This antibody labels CD3 epsilon and is a useful tool for the identification of T cells and related neoplasms
Clonality	Monoclonal
Clone number	F7.2.38
Isotype	IgG1
Research areas	› Immunology → Adaptive Immunity → T Cells → CD › Stem Cells → Hematopoietic Progenitors → Hematopoietic Stem Cells → Human Lineage Negative › Immunology → Adaptive Immunity → Regulatory T Cells

Associated products

Compatible Secondaries	› Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150113) › Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab205719)

Applications

Our Abpromise guarantee covers the use of **ab17143** in the following tested applications.

The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
IHC-P	★★★★★	1/10 - 1/25. Perform heat mediated antigen retrieval before commencing with IHC staining protocol. We suggest an incubation period of 30-60 minutes at room temperature.
IHC-FoFr	★★★★☆	Use at an assay dependent concentration.

Target

Function	The CD3 complex mediates signal transduction.
Involvement in disease	Defects in CD3D are a cause of severe combined immunodeficiency autosomal recessive T-cell-negative/B-cell-positive/NK-cell-positive (T(-)/B(+)/NK(+) SCID) [MIM:608971]. A form of severe combined immunodeficiency (SCID), a genetically and clinically heterogeneous group of rare congenital disorders characterized by impairment of both humoral and cell-mediated immunity, leukopenia, and low or absent antibody levels. Patients present in infancy recurrent, persistent infections by opportunistic organisms. The common characteristic of all types of SCID is absence of T-cell-mediated cellular immunity due to a defect in T-cell development.
Sequence similarities	Contains 1 ITAM domain.
Cellular localization	Membrane.

ab17143 has been referenced in 5 publications.

Alunno A *et al.* Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 6 in Rheumatoid Arthritis: A Possible Novel Chemotactic Factor? *Front Immunol* 8:554 (2017).	PubMed: 28572803
Terenzi R *et al.* Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) as a novel modulator of inflammation in rheumatoid arthritis synovium. *Sci Rep* 7:13293 (2017).	PubMed: 29038523
Cox AR *et al.* Resolving Discrepant Findings on ANGPTL8 in β-Cell Proliferation: A Collaborative Approach to Resolving the Betatrophin Controversy. *PLoS One* 11:e0159276 (2016). **IHC-P ; Mouse .**	PubMed: 27410263
Keijsers RR *et al.* In Vivo Induction of Cutaneous Inflammation Results in the Accumulation of Extracellular Trap-Forming Neutrophils Expressing RORγt and IL-17. *J Invest Dermatol* N/A:N/A (2013). **Human .**	PubMed: 24317395
Allbaud L *et al.* A new monoclonal anti-CD3epsilon antibody reactive on paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 48:1609-16 (2000).	PubMed: 11101629

Abordagem inteligente do teste imuno-histoquímico

- O corte histológico corado pelo H&E é, SEMPRE, a base do diagnóstico
- A IHQ é o teste mais indicado para responder a pergunta em questão?
- A IHQ é um teste poderoso, porém tem limitações
  - Ex. e-caderina nos histiocitomas
- Validação em diferentes espécies
- Resultado da IHQ é complementar ao H&E

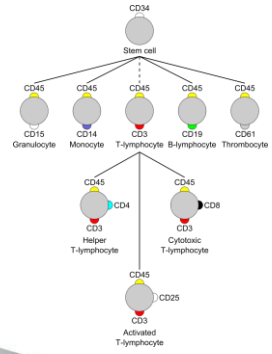
Biomarcadores na imuno-histoquímica diagnóstica

Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops [edit]

Since 1982 there have been nine Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops culminating in a conference

Workshop	City	Year	CDs assigned	Reference
I	Paris	1982	1-15	[7]
II	Boston	1984	16-26	[8]
III	Oxford	1986	27-45	[9]
IV	Vienna	1989	46-78	[10]
V	Boston	1993	79-130	[11]
VI	Kobe	1996	131-166	[12]
VII	Harrogate	2000	167-247	[13]
VIII	Adelaide	2004	248-339	[14]
IX	Barcelona	2010	340-364	[15]
X	Wollongong	2014	365-371	

- CD (*cluster of differentiation* ou *designation* ou *classification determinant)*



Onde acessar informações dos painéis diagnósticos e prognósticos, cut-offs, validações, clones?

- Livros
- Artigos
- Sites
  - VCGP

Table 3.3 Markers used for the differential diagnosis of major tumor categories

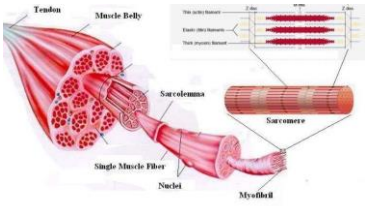
Tumor type	Markers[a,b]
Adrenal	*Primary:* Melan-A (cortex), tyrosine hydroxylase (medulla) *Secondary:* Inhibin-alpha and calretinin (cortex), PGP 9.5, chromogranins, and synaptophysin (medulla)
Cancer of unknown origin	*Primary:* CKs AE1/AE3 (carcinomas), vimentin (sarcomas), CD18 (leukocytic), S100 (melanocytic, neural) *Secondary:* Cytokeratin subtypes (carcinoma), generic endocrine markers, specific secretory products
Endocrine tumors (generic)	*Primary:* Chromogranin A, synaptophysin, PGP 9.5 *Secondary:* Neuron-specific enolase (NSE), S100
Epithelial vs. mesenchymal	*Primary:* Cytokeratins (epithelial) and vimentin (mesenchymal) *Secondary:* E-cadherin and claudin-1 (epithelium), p63 (basal cells, myoepithelium)
Leukocytic (histiocytic)	*Primary:* CD45 (panleukocytic), CD18 (panleukocytic marker with emphasis in histiocytic) *Secondary:* CD11d (splenic macrophages), E-cadherin (Langerhans cells AND other leukocytes), lysozyme (histiocytes), myeloid histiocytic antigen (histiocytes, myeloid cells), Ba1 (all histiocytes [macrophages and dendritic cells]), CD204 and CD163 (macrophages), CD90 (some dendritic cells and T-lymphocytes)
Liver	*Primary:* HepPar-1 (hepatocytes), cytokeratin 7 (bile duct epithelium), *Secondary:* Glypican-3, arginase, AFP (hepatocytes), CEA (hepatocytes and/or biliary epithelium), CK19 (hepatocytes and/or biliary epithelium)
Lung	*Primary:* TTF-1, Napsin A *Secondary:* CKs AE1/AE3, CK5, CK7, vimentin
Lymphoid	*Primary:* CD3 (T-cell), CD79a, CD20 and Pax5 (B-cell) *Secondary:* CD45 and CD18 (see note below), MUM1 (plasma cells)
Mast cell tumors	*Primary:* KIT (CD117), tryptase *Secondary:* OCT3/4, vimentin
Melanocytic tumors	*Primary:* Melan-A, PNL2, *Secondary:* S100, NSE, RACK1
Muscle differentiation	*Primary:* Smooth muscle actin (smooth muscle), actin sarcomeric (striated muscle), MyoD1 (rhabdomyosarcoma) *Secondary:* Actin muscle and desmin (all muscle), myoglobin (skeletal muscle), myosin smooth muscle (smooth muscle), p63 (myoepithelium), calponin (smooth muscle, myofibroblast, myoepithelium), CK5/6 (myoepithelium)
Neurogenic tumors	*Primary:* S100 (neurons, glial cells, meningothelial cells), GFAP (glial cells, ependymal cells), CNPase and Olig2 (oligodendroglioma, PNST) *Secondary:* NeuN, neurofilament (neurons), natural killer, glut1 and nerve growth factor receptor (perineural cells), cytokeratins (choroid plexus), vimentin (ependymal cells, meningothelial cells), synaptophysin (neurons, choroid plexus), CD34 or E-cadherin (meningothelial cells), periaxin and Sox 10 (peripheral nerve sheath tumors)
Pancreas (endocrine)	*Primary:* Insulin, glucagon, somastostatin, gastrin *Secondary:* Synaptophysin, PGP 9.5, chromogranin A
Renal	*Primary:* Pax8, Napsin A *Secondary:* CD10, CKs AE1/AE3, vimentin, KIT
Squamous vs. adenocarcinoma	*Primary:* CK5 (squamous cell carcinoma), CK7 (adenocarcinoma) *Secondary:* p63 (squamous cell carcinoma), CK18 (adenocarcinoma)
Testis and ovary	*Primary:* GATA4, inhibin-α (sex cord-stromal tumors), calretinin (germ-cell tumors) *Secondary:* Mullerian inhibiting hormone (Sertoli cell tumor), NSE (sex cord-stromal tumors), KIT, PGP 9.5 (germ cell tumors)
Thyroid	*Primary:* Thyroglobulin (follicular cells), calcitonin (medulla [C-cells]), *Secondary:* TTF-1 (follicles and medulla), Pax8 (follicles and medulla), Napsin A (mostly medulla)
Urothelial tumors	*Primary:* Uroplakin III and uroplakin II *Secondary:* Cytokeratin 7, COX-2, COX-1, p63, GATA3, placental S100
Vascular tumors (endothelium)	*Primary:* Factor VIII–related antigen and CD31 *Secondary:* CD34 (all vessels), LYVE-1 and Prox-1 (lymphatic vessels)

https://vcgp.org/

Casos

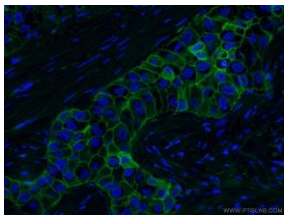
https://plataforma.labcloud2.com.br/login/login_lab/vetpat

- 1) Actinas (citoplasmática)



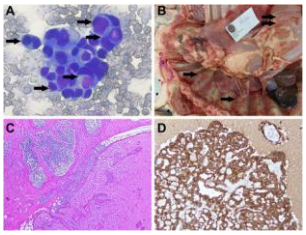
- 1) Actinas (citoplasmática)
  - 6 isoformas (alfa actina de músculo liso)
  - Tecidos com diferenciação miogênica pura, miofibroblastos e mioepitélio

- 2) Caderinas (membrana)
  - E-caderina (E-CAD)) (junção aderente nos epitélios)



- 2) Caderinas (membrana)
  - E-caderina (E-CAD)) (junção aderente nos epitélios)
  - Redução da expressão ou translocação celular: associada ao aumento do potencial de malignidade
    - Metástase de carcinoma mamário: redução e translocação citoplasmática
    - Células de Langerhans e histiocitoma

- 3) Calretinina (citoplasma)
  - Proteína intracelular ligante de cálcio
    - Diagnóstico de mesoteliomas



Ferreira FC e tal. Four cases of cell cannibalism in highly malignant feline and canine tumors. Diagnostic Pathology, 2015.

- 3) CD3
  - Expressão: pró-timócito>linfócito T maduro
  - Ligação covalente (TCRα/β or TCRγ/δ)
  - Especificidade molecular altíssima
  - Diagnóstico de linfomas e leucemias
  - Ex. DII crônica, linfocítica ou linfoplasmocítica x linfoma

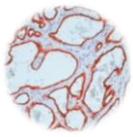
- 4) CD11/CD18 (membrana e/ou citoplasmática)
  - Moléculas de adesão leucocitária
  - CD18=subunidade β_2 (histiócitos, macrófagos, dendríticas, Langerhans, monócitos)
  - Subunidades α
    - CD11a: pan-leucocitária
    - CD11b: granulócitos, monócitos, macrófagos
    - CD11c: granulócitos, monócitos, APC dendríticas)
    - CD11d: CD8+, linfócitos granulares, macrófagos, macrófagos medulares)

- 4) CD11/CD18 (membrana e/ou citoplasmática)
  - CD18: usado nas desordens histiocíticas em conjunto com outros marcadores linfocítico e leucocitários

- 5) CD20 (membrana)
  - Pré-linfócito B>linfócito B ativado
  - Ótimo substituto para o CD79 em gatos
  - Linfomas e plasmocitoma (20%)

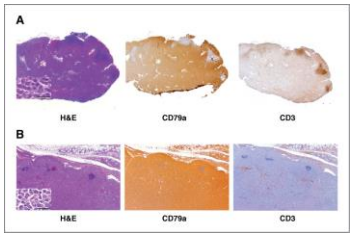
- 6) CD31 (membrana)
  - PECAM-1
  - Células endoteliais, megacariócitos, plaquetas
  - Especificidade molecular alta: tumores endoteliais
  - Macrófagos e alguns carcinomas podem expressar

- 7) CD34 (citoplasma)
  - Precursores mielóides e linfóides
  - Tumores vasculares benignos e malignos



- 8) CD45 (citoplasma)
  - Família de proteínas conhecidas como antígeno comum de leucócitos (linfócitos, monócitos, macrófagos e granulócitos)
  - Superfície da maioria dos leucócitos
  - Ausente em megacariócitos e eritrócitos

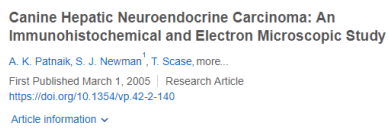
- 9) CD79α (citoplasma e membrana)
  - Pré-pró célula B > plasmócitos
  - Expressão aberrante em músculo liso



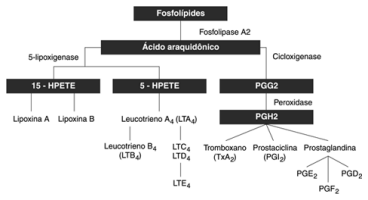
- 10) CD117 (citoplasma, membrana, paranuclear)
  - KIT
  - Stem cell hematopoiéticas, mastócitos, queratinócitos basais da epiderme, melanócitos, células germinativas, células de Cajal e tumores correlatos
  - Valor prognóstico em MCT de cães e gatos
  - Valor prognóstico em melanomas caninos (correlação a sobrevida)

- 11) CD163 e CD204 (citoplasma, membrana, paranuclear)
  - Restritos a linhagem de macrófagos e monócitos
  - Não são expressos em células dendríticas, Langerhans ou histiocitomas

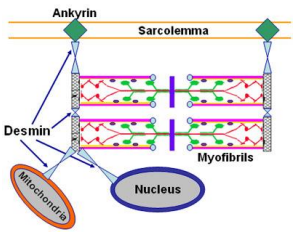
- 12) Cromograninas (citoplasma)
  - A, B e C
  - Presentes no grânulos secretórios de células neuroendócrinas



- 13) COX-2 (citoplasma)
  - Carcinomas uroteliais, mamários, CEC, intestinais
  - Difícil interpretação: diversos anticorpos, pontos de corte, sistemas de graduação



- 14) Desmina (citoplasma)
  - Estrutural, não participa na contração
  - Ausente em células mioepiteliais



- 15) DOG-1 (citoplasma e membrana)
  - *Discovered on GIST 1*
  - Células de Cajal
  - 5-10% GIST´s humanos são negativos para KIT, porém DOG-1 positivos


DOG1 is a sensitive and specific immunohistochemical marker for diagnosis of canine gastrointestinal stromal tumors

Deanna D. Dailey[†], E. J. Ehrhart, Dawn L. Duval, more...

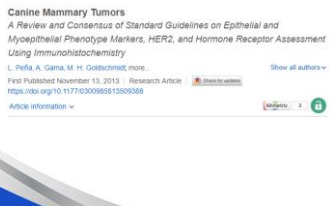
Show all authors

First Published April 10, 2015 | Research Article

https://doi.org/10.1177/1040638715578878

Article information

- 16) Receptores de estrógeno e progesterona (nuclear)
  - Carcinomas mamários<adenomas
  - Validade em veterinária é questionável


Canine Mammary Tumors

A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry

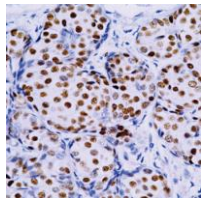
L. Peña, A. Gama, M. H. Goldschmidt, more...

Show all authors

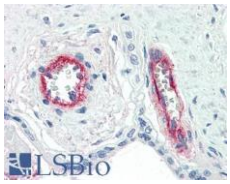
First Published November 13, 2013 | Research Article

https://doi.org/10.1177/0300985813509388

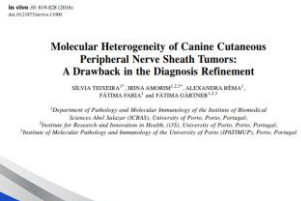
Article information

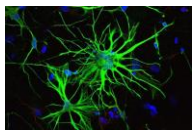


- 17) Fator VIII (citoplasma)
  - Marcador endotelial
  - Específico para hemangiossarcomas e linfangiossarcomas
  - Menor sensibilidade em HSA pouco diferenciados

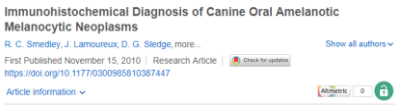


- 18) GFAP (citoplasma)
  - Astrócitos, células ependimárias,
  - Marcação variável em células de Schwann, mioepitélio e condrócitos


Molecular Heterogeneity of Canine Cutaneous Peripheral Nerve Sheath Tumors: A Drawback in the Diagnosis Refinement



- 19) Melan A (citoplasma)
  - Gene *MART-1*
  - Melanócitos
  - Usado em *cocktails* para diagnóstico de lesões melanocíticas (PNL2, Melan-A, TRP-1, TRP-2)


Immunohistochemical Diagnosis of Canine Oral Amelanotic Melanocytic Neoplasms

R. C. Smedley, J. Lamoureux, D. G. Sledge, more...

Show all authors

First Published November 15, 2010 | Research Article

https://doi.org/10.1177/0300985810387447

Article information

- 20) MUM1 (nuclear)
  - >90% dos plasmocitomas positivos


Immunohistochemical Detection of Multiple Myeloma 1/Interferon Regulatory Factor 4 (MUM1/IRF-4) in Canine Plasmacytoma: Comparison with CD79a and CD20

J. A. Ramos-Vara, M. A. Miller, V. E. O. Valli,

First Published November 1, 2007 | Research Article

https://doi.org/10.1354/vp.44-6-875

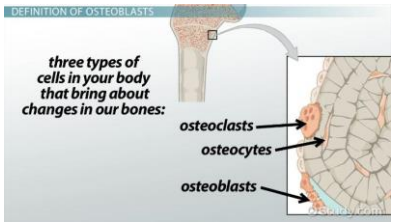
Article information

- 21) Myo-D1 (nuclear)
  - Diferenciação miogênica de células mesenquimais embrionárias
  - Não é expresso em rabdomiócitos maduros
  - Expresso nos rabdomiossarcomas


A Comparative Review of Canine and Human Rhabdomyosarcoma With Emphasis on Classification and Pathogenesis
B. G. Caserto, DVM, Dipl ACVP,
First Published February 25, 2013 | Research Article | Check for updates
https://doi.org/10.1177/0300985813476069
Article information
Altmetric 2

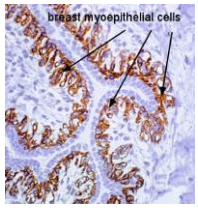
- 22) Mioglobina (citoplasma)
  - Expresso em rabdomiócitos maduros
  - Não expresso em neoplasias musculares embrionárias

- 23) Osteocalcina (citoplasma)
  - Especificidade molecular questionável na veterinária



- 24) p63 (nuclear)
  - Carcinomas *in situ* x invasores
  - Não é expressa por miofibroblastos


p63: A Novel Myoepithelial Cell Marker in Canine Mammary Tissues
A. Gama, A. Alves, F. Gartner, more...
First Published July 1, 2003 | Research Article
https://doi.org/10.1354/vp.40-4-412
Article information
Altmetric 0



- 25) PAX-5 (nuclear)
  - Pré-pró B até estágios anteriores ao plasmócitos
  - *Dowregulated* ou ausente em plasmócitos
  - Linfomas CD3+/CD79+ em cães
    - PAX-5: desempate (PAX5+=B; PAX5-=T)


Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B- and B-cell marker
M. Willmann, R. Bob, L. Mullauer, A. Gulja de Arespacochaga, M. Reifinger, I. Mosberger, J.G. Thalhammer
Show more
https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.019
Get rights and content

- Quais são os *endpoints* padrão ouro na investigação prognóstica?
  - Metástase
  - Taxa de recidiva
  - Intervalo livre da doença
  - Sobrevida
    - Portanto, a importância prognóstica dos biomarcadores citados deve correlacionar-se aos *endpoints*.

Recommended Guidelines for the Conduct and Evaluation of Prognostic Studies in Veterinary Oncology

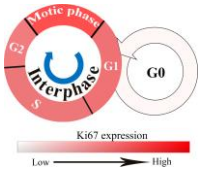
J. D. Webster, M. M. Dennis, N. Dervisis, J. Heller, N. J. Bacon, P. J. Bergman, D. Bienzle, G. Cassali, M. Castagnaro, J. Cullen, D. G. Esplin, L. Peña, M. H. Goldschmidt, K. A. Hahn, C. J. Henry, E. Hellmén, D. Kamstock, J. Kirpensteijn, B. E. Kitchell, R. L. Amorim, S. D. Lenz, T. P. Lipscomb, M. McEntee, L. D. McGill, C. A. McKnight, P. M. McManus, A. S. Moore, P. F. Moore, S. D. Moroff, H. Nakayama, N. C. Northrup, G. Sarli, T. Scase, K. Sorenmo, F. Y. Schulman, A. M. Shoieb, R. C. Smedley, W. L. Spangler, E. Teske, D. H. Thamm, V. E. Valli, W. Vernau, H. von Euler, S. J. Withrow, S. E. Weisbrode, J. Yager, M. Klupel

First Published July 27, 2010 | Review Article

https://doi.org/10.1177/0300985810377187

Biomarcadores imuno-histoquímicos e prognóstico

- 1) Marcadores de proliferação celular
  - Ki-67
    - Mensura a fração de crescimento



- 2) Marcadores de malignidade
  - Malignos x benignos
    - PD-1, PSA, PSMA, PGP 9.5, PROX1, RACK1 (melanomas x melanocitomas), S100, SOX-10, somatostatina, SP-A, sinaptofisina, tireoglobulina, TTF-1, UPIII, vimentina

Diagnóstico imuno-histoquímico das metástases de origem desconhecida

- CUPS (*cancer of unknow primary site*)
  - Principais órgãos: fígado, pulmão, ossos (carcinomas)
  - Objetivo: identificar a linhagem celular, permitindo um tratamento mais direcionado
  - Uso de exames complementares (estreitamento do painel)
    - Ex. Paciente com metástase óssea de carcinoma de origem indeterminada

- CUPS (*cancer of unknow primary site*)
  - 1º etapa
    - Triagem por categorias amplas
      - Diferenciação leucocítica (CD45 e/ou CD18), melanocíticas (Melan A ou PNL-2), epitelial (citoqueratinas) ou mesenquimal (vimentina)

- CUPS (*cancer of unknow primary site*)
  - 2º etapa
    - Triagem para tumores epiteliais (pancitoqueratina positivos)
      - Citoqueratinas de baixo peso molecular
      - Citoqueratinas de alto peso molecular

- CUPS (*cancer of unknow primary site*)
  - 2º etapa
    - Citoqueratinas de baixo peso molecular
      - CK8 e 18
      - CK19
      - CK7
      - CK20

- CUPS (*cancer of unknow primary site*)
  - 2º etapa
    - Citoqueratinas de alto peso molecular
      - CK 5 e 6
      - Anticorpo 34βE12 (ck´s 1, 5, 10 e 14)

- CUPS (*cancer of unknow primary site*)
  - 3º etapa
    - Determinação da expressão concomitante de Vimentina e Citoqueratina
      - Carcinomas renais, folicular de tireóide, glândula salivar e uterino
      - Essa etapa permite restringir ainda mais os possíveis candidatos

- CUPS (*cancer of unknow primary site*)
  - 4º etapa
    - Detecção de produtos celulares específicos
      - Ex. tireoglobulina

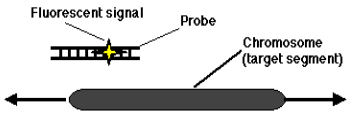
Hibridização/hidridação “in situ”

- É uma técnica citogenética molecular que utiliza sondas marcadas para detecção de sequências específicas de DNA, RNA e anomalias cromossômicas em cortes teciduais ou esfregaços
- Definição: é o pareamento de nucleotídeos contidos em fitas complementares de DNA e RNA através de ligações de hidrogênio numa lâmina de vidro.
- Cromogênica (*CISH*)
- Fluorescente (*FISH*)

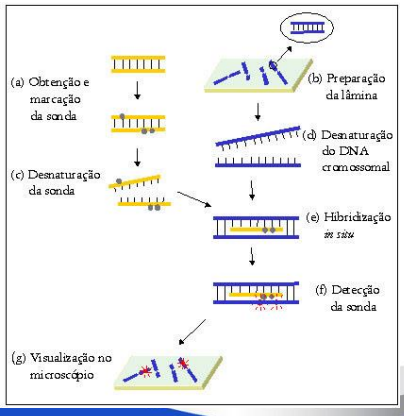
Indicações

- Aneuploidias
- Poliploidias
- Diagnóstico pré-implantação
- Microdeleções gênicas
- Rearranjos gênicos
- Amplificações gênicas

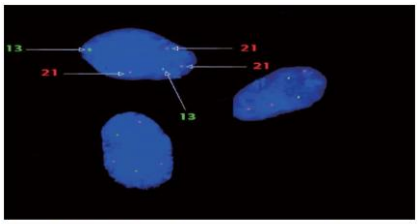
Sonda



Sequência alvo



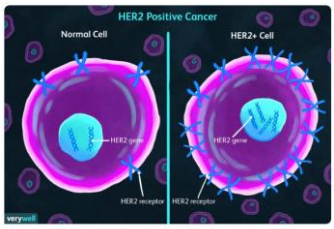
Trissomia do 21



FISH analysis of uncultured amniocytes showing trisomy 21 and normal number for chromosome 13.

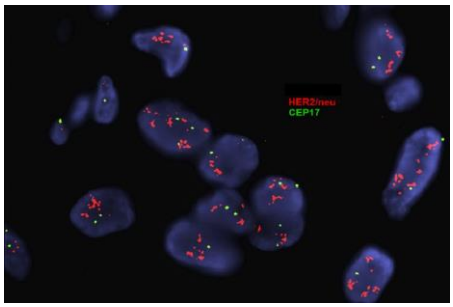
ORIGINAL ARTICLE

Prenatal diagnosis of aneuploidy among a sample of Egyptian high risk pregnancies



Verywell / Brianna Gilmartin

- **HER2/neu** é um proto-oncogene localizado no cromossomo 17 e que codifica uma oncoproteína transmembrana, a p185^{HER2}.
- A presença do HER2/neu determina rápida proliferação do tumor e alta agressividade.
- Através de sondas de DNA complementares marcadas com fluorocromo, pode-se visualizar um número aumentado de cópias do gene em relação às duas cópias normalmente existentes.



https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsbreasther2.html

STANDARD ARTICLE

Journal of Veterinary Internal Medicine ACVIM

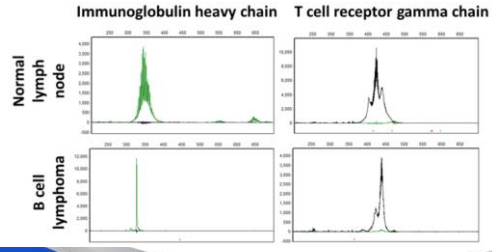
Polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangement: Benchmarking performance of a lymphoid clonality assay in diverse canine sample types

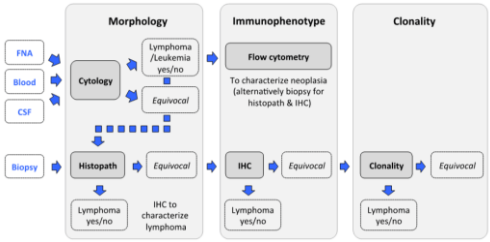
E. J. Ehrhart[1,2] | Shukmei Wong[3] | Keith Richter[1,2] | Victoria Zismann[3] | Carolyn Grimes[1,2] | William Hendricks[3] | Chand Khanna[1,2]

Histopathologic discrimination of lymphoid malignancies in dogs from benign, reactive hyperplasia can be difficult in some cases, such as early lymphoma that does not efface nodal architecture, nodular lymphoma that mimics the architecture of a normal node, or lymphoma emerging in a patient with systemic inflammatory disease. Polymerase chain reaction (PCR) for antigen receptor rearrangement (PARR) is a molecular test for clonality that enables such discrimination.1,2 Normal lymphocytes acquire unique antigen receptors during maturation through rearrangements of the V(D)J regions of T-cell and B-cell receptor genes (TRG [T-cell receptor gamma gene] and immunoglobulin heavy chain gene [IGH]) and are thus polyclonal at these genetic loci. However, lymphomas arise from clonal expansion of a single progenitor cell and therefore are characterized by monoclonal receptor loci. Lymphoma monoclonality can be detected using PARR, which incorporates PCR protocols to amplify specific sequences from lymphocyte DNA. Thus, PARR is based on identification of monoclonal lymphomas versus polyclonal benign or reactive tissues

https://vetmedbiosci.colostate.edu/chl/principles-of-testing/

PCR for Antigen Receptor Rearrangement (PARR)





https://www.uoguelph.ca/ahl/content/companion-animals-1

Pontos-chave para o diagnóstico

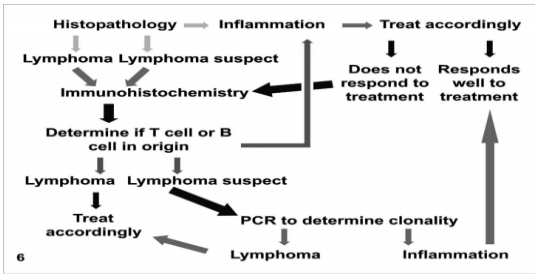
- Análise de clonalidade (PAAR): *TCR*
  - Resultados falso-negativos
    - Baixa sensibilidade da técnica em linfomas intestinais
      - Distribuição desigual dos linfócitos neoplásicos
      - *Background* policlonal
      - *Primers*
      - Aberrações cromossômicas

Pontos-chave para o diagnóstico

- Análise de clonalidade (PAAR): *TCR*
  - Resultados falso-positivos
    - Distúrbios inflamatórios

Pontos-chave para o diagnóstico

- Análise de clonalidade (PAAR): *TCR e IGH*
  - Infidelidade de linhagem (genótipo duplo em linfomas T ou B)
  - Linfomas compostos (proliferação monoclonal de linfócitos T e B)



Algoritmo diagnóstico (Kiupel e col. 2011)