

RAFAEL MALAGOLI ROCHA

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO ENTRE OS  
NOVOS ANTICORPOS MONOCLONAIS DE COELHO E  
ANTICORPOS CLÁSSICOS PARA AVALIAÇÃO DE  
RECEPTORES HORMONAIIS EM CÂNCER DE MAMA  
USANDO *ARRAYS* DE TECIDOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Patologia da Universidade Federal  
de Minas Gerais, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de mestre em  
Patologia

Área de concentração: Patologia Geral

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Helenice Gobbi

Co-orientador: Vicente de Paula Antunes Teixeira

Belo Horizonte – 2006

"Um galo sozinho não tece uma manhã:  
ele precisará sempre de outros galos.  
De um que apanhe esse grito que ele  
e o lance a outro; de um outro galo  
que apanhe o grito de um galo antes  
e o lance a outro; e de outros galos  
que com muitos outros galos se cruzem  
os fios de sol de seus gritos de galo,  
para que a manhã, desde uma teia tênue,  
se vá tecendo, entre todos os galos".

João Cabral de Melo Neto

A Minha filha Isabela

Trabalho realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Coordenação Nacional de Pesquisa (CNPq).

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Helenice Gobbi pela dedicação ao trabalho e exemplo de competência.

Ao Professor Vicente de Paula Antunes Teixeira, meu co-orientador, mestre, filósofo.

Aos Professores do programa de Pós-graduação em Patologia da UFMG por todo o empenho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Patologia Mamária: Gislene Rocha, Luciene Tafuri, Cristiana Nunes, Vanessa Zschaber, Fernanda Sanches, Flávio Nepomuceno, Marcio Salles e Marina Alvarenga e ao Victor Piana Andrade, pelas dicas iniciais que deram origem ao nosso *array* alternativo.

À Luciene Tafuri pela enorme ajuda com as referências bibliográficas e ao Rair Geraldo Xavier pela ajuda com a análise estatística.

Aos grandes amigos de Belo Horizonte: Filhinho, Uga, Rates e Dondons.

Aos velhos amigos de Uberaba e Patos de Minas: Clerison, Daniel, Fred, Tony, Boca, Lívia, Letícia, Neid, Fernanda, Ívia, Tetê, Roberta, Caroline, Raquel,

Davi, Digão, Breno, Marta e todo o pessoal do Marista Diocesano, do Number One Uberaba e da UFTM.

Ao meu querido amigo Bruno Fortes.

Aos grandes amigos: Márcio, Soraya, André, Amanda, Aluísio e Guto, por terem mudado a minha vida.

Ao meu pai Carlos, minha mãe Ângela, e minhas irmãs Renata e Bruna pelo amor.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	8
Lista de figuras	9
Lista de tabelas	10
Resumo	11
Abstract	13
Introdução geral	15
Justificativa	22
Objetivos	23
Material e métodos	24
Artigo 1	25
Artigo 2	43
Conclusões Gerais	63
Anexo	64
Apêndice	67
Referências bibliográficas	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>Her2</b>	Gene e proteína Her2
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>IHC</b>	<i>Immunohistochemistry</i>
<b>IIQ</b>	Imunoistoquímica
<b>Ki67</b>	antígeno de proliferação Ki67
<b>Mab</b>	Anticorpo monoclonal de camundongo
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>PBS</b>	Tampão salina-fosfato ( <i>phosphate saline buffer</i> )
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>p53</b>	Proteína p53
<b>RabMab</b>	Anticorpo monoclonal de coelho
<b>RE</b>	Receptor de estrógeno
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>TMA</b>	<i>Array de tecidos (tissue microarray)</i>
<b><math>\chi^2</math></b>	Teste estatístico do qui quadrado

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 (Introdução geral)** – Construção de um TMA. a) Retirada de um cilindro de tecido após a identificação da área representativa no bloco doador. b) Introdução do cilindro de tecido no bloco receptor. c) Colagem da fita adesiva no bloco de TMA, microtomia, e a retirada da fita após a secção estar fixa na lâmina..... **20**

**Figura 2 (Introdução geral)** – Secção do bloco de TMA contendo 532 cilindros de tecido de tumor renal corada pelo H&E. Discos de tecido corados pelo H&E morfologicamente preservados e dois discos corados pela IIQ para vimentina..... **21**

**Figura 1 (Artigo 1)** – Mini-retífica acoplada a uma bancada fixa com uma alavanca, local de encaixe da agulha de biópsia hepática e retirada do cilindro de tecido parafinizado do interior da agulha..... **36**

**Figura 2 (Artigo 1)** – Bloco receptor do modelo artesanal de TMA contendo 55 cilindros e a secção de um cilindro em aumento de 10X corada pela IIQ com anticorpo anti-RE, clone 6F11 (Biogenex®)..... **37**

**Figure 1 (Artigo 2)** – Immunostainings for different clones of Mab and RabMab anti-ER and anti-PR (40x)..... **54**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 (Artigo 1) –</b> Anticorpos, clones, fabricantes e diluições empregados nas reações IIQ.....	<b>35</b>
<b>Table 1 (Artigo 2) –</b> Antibodies, clones, dilutions, and suppliers of the rabbit and mouse monoclonal antibodies against estrogen and progesterone receptors.....	<b>48</b>
<b>Table 2 (Artigo 2) –</b> Evaluation of estrogen receptor in 24 breast cancers using rabbit monoclonal antibodies (SP1 and B644) and mouse monoclonal antibodies (6F11 and 1D5 from three different suppliers).....	<b>51</b>
<b>Table 3 (Artigo 2) –</b> Evaluation of progesterone receptor in 24 breast cancers using rabbit monoclonal antibodies (SP2 and B645) and mouse monoclonal antibodies (PGR312 and PGR636).....	<b>53</b>

## RESUMO

**Introdução:** A avaliação imunoistoquímica (IIQ) dos receptores hormonais em câncer de mama é atualmente fator preditivo bem estabelecido da resposta terapêutica. No entanto, não há consenso na literatura sobre quais os melhores anticorpos a serem utilizados. Recentemente foi lançada uma nova geração de anticorpos monoclonais de coelho (RabMab) que, segundo os fabricantes, têm alta sensibilidade e especificidade. **Objetivos:** Neste trabalho, comparamos a expressão dos anticorpos clássicos de camundongo e dos novos RabMab anti-receptores de estrógeno e progesterona (RE e RP) em *arrays* de tecidos construídos com um equipamento alternativo e de baixo custo. **Metodologia:** Utilizou-se equipamento não comercial que consiste numa mini-retífica com agulha de biópsia hepática de 2mm de diâmetro acoplada a bancada com suporte (Dremel®). Inicialmente preparou-se o bloco receptor fazendo o número de furos desejável (55). Cilindros de tecido foram obtidos com o mesmo dispositivo e colocados nos orifícios do bloco receptor. De cada bloco doador foram obtidos dois cilindros de diferentes áreas representativas do tumor. As secções histológicas obtidas foram submetidas à IIQ empregando-se anticorpos anti-RE (1D5; 6F11; SP1 e B644) e anti-RP (PgR 312; PgR 636; SP2 e B645). A intensidade da coloração IIQ e a coloração inespecífica foram avaliadas semiquantitativamente por um mesmo pesquisador. Os tumores foram considerados positivos quando mais de 10% dos núcleos das células neoplásicas

estavam corados independente da intensidade. **Resultados e conclusões:** O equipamento e técnica de construção do TMA alternativo representam uma opção econômica aos equipamentos comerciais. Cortes histológicos do *array* mostraram boa preservação tecidual, adequados para avaliação morfológica e suficientes para confirmação diagnóstica. A análise comparativa mostrou que os clones de RabMab anti-RE apresentaram maior sensibilidade comparados ao clone 1D5 e equivalência ao clone 6F11 e representam uma alternativa confiável aos Mab para avaliação IIQ de tumores mamários. RabMab anti-RP foram mais sensíveis que os Mab.

## ABSTRACT

**Introduction:** Immunohistochemistry analysis (IHC) for estrogen and progesterone receptors (ER and PR) in breast cancer is a well established predictive factor of anti-estrogen therapy. However, there is a large variable choice of antibodies and no agreement about the best antibodies to be used. A novel generation of rabbit monoclonal antibodies (Rab Mab) has been released recently. **Aims:** In this study, we compared the performance of the novel RabMab to Mab using an alternative tissue arrayer. **Methods:** We used non-commercial equipment that consists of a work station (Dremel®) to which a liver biopsy needle of 2mm of diameter was connected. A receptor block was prepared perforating it until the desired number of rows (55) was reached. Then, the cylinders of tissue were obtained using the same equipment and included in the holes of the receptor block. Two samples were obtained from different tumor areas of each donor block. Histological sections were immunostained using anti-ER Mab (1D5 and 6F11) and RabMab (SP1 and B644), and anti-PR Mab (PgR312 and PgR636) and RabMab (SP2 and B645). The intensity of the reaction and the background were semiquantitatively evaluated and the tumors in which more than 10% of the tumor cell nuclei stained was considered positive. **Results and conclusions:** The equipment and technique used in the present study represent an economical alternative when compared to commercial equipment. The slides showed fine tissue preservation, adequate for morphologic evaluation, and sufficient to confirm diagnosis. The comparative analysis of the

RabMab anti-ER and anti-PR showed more sensibility compared to clone 1D5 and concordance with clone 6F11 and represent a reliable alternative to Mab for IHC evaluation of breast tumors. RabMab anti-PR were more sensitive than Mabs.

## INTRODUÇÃO GERAL

### Os marcadores moleculares em câncer de mama:

Consideram-se fatores prognósticos em câncer de mama as características clínicas das pacientes e os aspectos patológicos e biológicos dos tumores que permitem prever a evolução clínica da doença ou sobrevida das pacientes no momento do diagnóstico inicial (ALLRED, et al., 1998). Vários fatores prognósticos têm também valor preditivo. Um marcador prognóstico para ter validade deve possuir valor preditivo independente e significado estatístico validado por testes clínicos (ALLRED, et al., 1998; SCHMITT, 1999).

Em reunião de consenso, o Colégio Americano de Patologia (CAP) estratificou os fatores prognósticos do câncer de mama em três categorias. A categoria I inclui os fatores já validados como importantes no prognóstico e úteis na conduta clínica dos pacientes. Na categoria II foram englobados os fatores prognósticos que têm sido intensamente estudados do ponto de vista da biologia e da clínica, mas que ainda precisam ser validados em estudos estatísticos consistentes. A categoria III inclui todos os outros fatores ainda não suficientemente estudados para demonstrar seu fator prognóstico. Dentro da primeira categoria definida pelo CAP encontramos os seguintes fatores prognósticos: estadiamento, grau histológico, tipo histológico, número de mitoses e receptores hormonais (receptor de estrógeno e progesterona) (FITZGIBBONS, et al., 2000).

O estrógeno tem sido associado à estimulação do crescimento normal do epitélio da mama, mas também pode estar associado a muitos fatores de risco de câncer. Este hormônio age nas células via RE estimulando sua atividade mitogênica e a determinação de seus receptores (RE e RP) por imunistoquímica tem valor prognóstico e preditivo na terapêutica (SCHMITT, et al., 1994). Desta forma, o conhecimento de marcadores moleculares de neoplasia mamária pode ajudar a identificar mulheres com risco aumentado de câncer de mama e facilitar o desenvolvimento de terapias profiláticas (GOBBI *et al.*, 2000). O risco de se desenvolver câncer de mama em mulheres portadoras de hiperplasia epitelial sem atipias e com RE positivo em lóbulos normais é duas vezes maior que em pacientes com lóbulos normais RE-negativo (GOBBI *et al.*, 2005).

Há uma grande variação nas metodologias utilizadas para testar RE e RP através de imunistoquímica na rotina dos laboratórios e, como resultado, ainda não há uma padronização universalmente aceita desta tecnologia (JACOBS, et al., 1996). Como qualquer outro método de laboratório, os detalhes metodológicos precisos têm um grande efeito nos resultados finais. Um controle de qualidade na avaliação de fatores preditivos através de IHQ é necessário para avaliar a qualidade dos ensaios imunistoquímicos e a variação intra e inter-laboratórios. A falta de reprodutibilidade entre os resultados de um mesmo laboratório, ou entre diferentes laboratórios na avaliação dos RE e RP, são responsáveis por resultados discrepantes em ensaios clínicos na literatura (HAMMOND, et al., 2003).

Através da imunistoquímica, o pesquisador pode observar o sítio específico do receptor nas células neoplásicas, distinguir atividade de RE e RP das células neoplásicas da sua presença no epitélio mamário benigno vizinho à neoplasia e

determinar a presença dos receptores mesmo em casos em que o material disponível para análise é pequeno como, por exemplo, em citologia aspirativa (SCHMITT, et al., 1995).

### **Os arrays de tecido (TMA):**

A tecnologia do TMA foi recentemente desenvolvida na tentativa de propiciar uma melhor forma de análise morfológica e molecular de grande número de tecidos tumorais (KONONEN, 1998). O TMA torna possível a análise de até 1000 amostras tumorais em apenas uma lâmina que pode ser analisada pelo H&E, FISH (Fluorescence in situ hybridization), RNA in situ hybridization ou imunoistoquímica (Figura 2). Esta tecnologia acelera significativamente estudos moleculares que buscam associações entre variações moleculares e aspectos clínico – patológicos do câncer (MOCH, 2001).

Dentre as formas de aplicação do TMA estão os testes de anticorpos, a organização de um banco de tecidos – controle e a possibilidade de estudos comparativos. TMA pode ser usado para fins educacionais assim como para melhorar controles de qualidade e padronizações de métodos de coloração e interpretações. Os TMA se tornaram uma das mais promissoras ferramentas para o pesquisador molecular e terá muitas aplicações na investigação do câncer assim como em outros campos da patologia (MOCH, 2001).

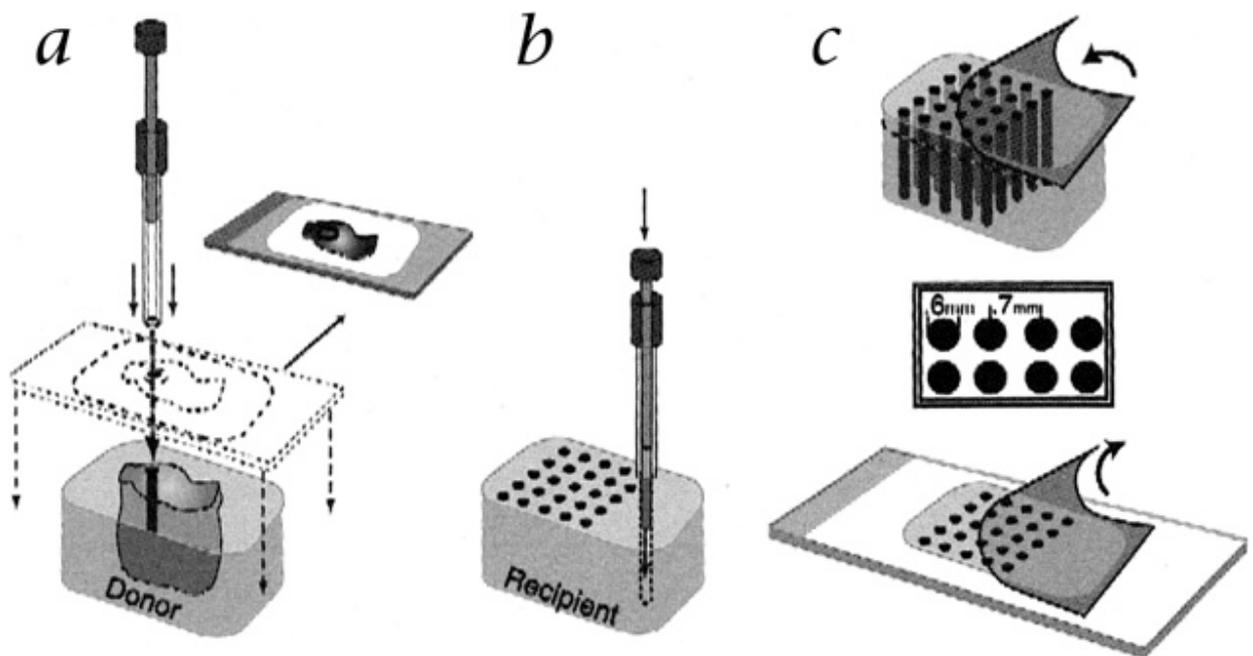
Na tentativa de minimizar os custos da técnica de IIQ através da economia de reagentes um novo aprimoramento técnico tem sido largamente utilizado: os “*Tissue Microarrays*” (TMA). Os TMA permitem a análise retrospectiva em larga

escala da expressão protéica dos tumores através da imunohistoquímica, sendo possível conhecer a expressão de uma determinada proteína em até 1000 casos diferentes em apenas uma lâmina histológica (CAMP, et al., 2000). Esta técnica apresenta acurácia comprovada que justifica seu emprego com amplas vantagens de custo e tempo para os estudos retrospectivos de grandes centros ou estudos cooperativos com grandes bancos de dados (HOOS, et al., 2001). O TMA tem sido considerado uma etapa necessária à consolidação do conhecimento adquirido através do mapeamento genético dos estudos realizados com a técnica de “cDNA Microarrays”. A técnica de “cDNA microarrays” determina quais dezenas ou centenas de genes estão hiperexpressos ou hipoexpressos em um tumor e que poderiam culminar com alguma particularidade biológica tal como o rápido crescimento, o potencial de recorrência local ou de metástase à distância ou ainda resistência à quimioterapia (HARVEY, et al., 1999). A técnica de TMA pode ser utilizada na investigação destes genes hiperexpressos ou hipoexpressos em grandes estudos retrospectivos, comparando-os com a sobrevida dos pacientes, a fim de identificar aqueles que apresentaram papel mais relevante no comportamento biológico dos tumores e que, portanto, seriam elegíveis como alvos de novas estratégias terapêuticas (TAVASSOLI, et al., 2003).

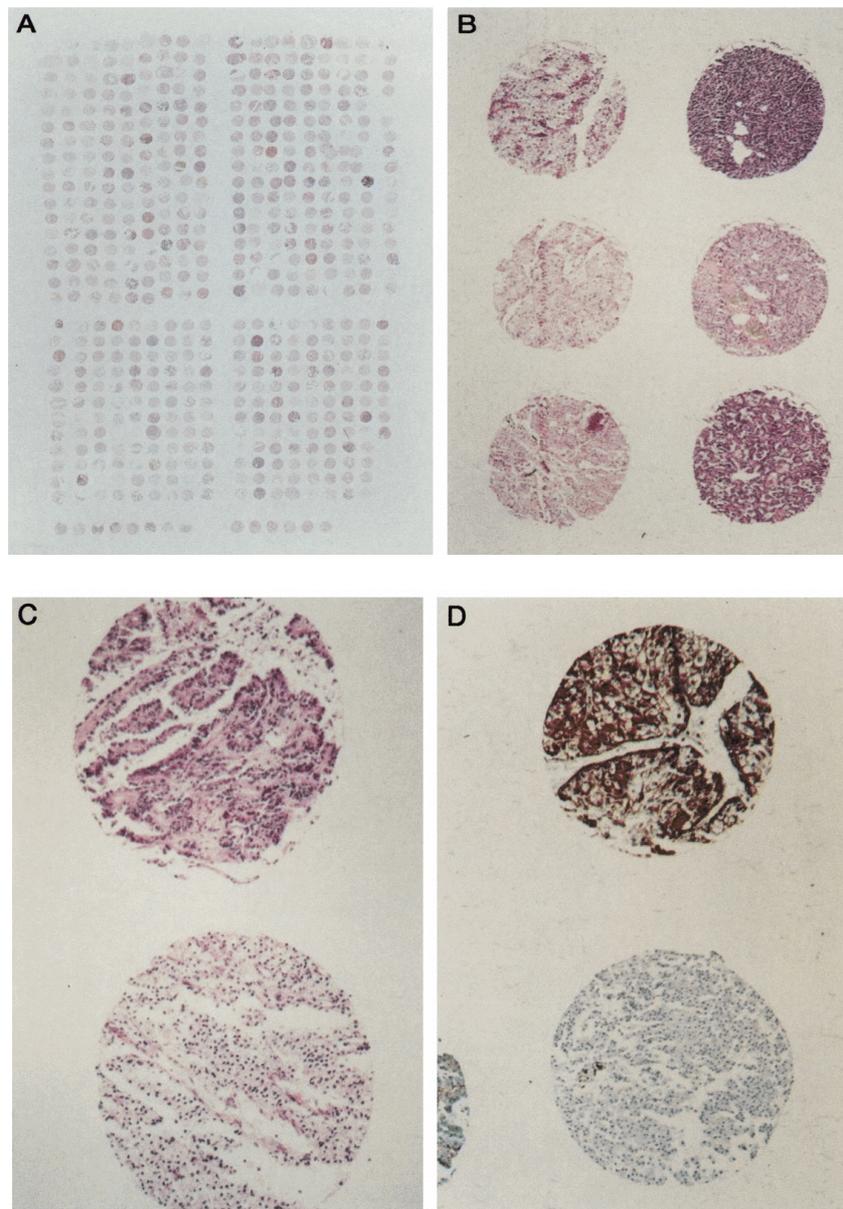
Um grupo de pesquisadores europeus descreveu pela primeira vez a especificidade da expressão protéica usando o sistema de anticorpos em TMA. Os estudos para validação do método TMA no carcinoma da mama demonstraram ser possível atingir 98% de concordância com as reações nos cortes histológicos usuais para marcadores imunohistoquímicos como o receptor de estrógeno e Her2-neu utilizando-se três amostras de 0,6 mm de diâmetro de cada caso. Quando se

utilizou apenas duas amostras a concordância obtida foi de 94%. A amostragem de mais de uma área nos carcinomas de mama se faz necessária para que nos TMA esteja representada toda a heterogeneidade destes tumores (HOOS, et al., 2001).

Para a construção do TMA, cilindros de 0,6 a 2mm são retirados de centenas de tecidos incluídos em diferentes blocos doadores e precisamente arranjados em um novo bloco (bloco receptor) em linhas e colunas utilizando um instrumento de precisão comercialmente disponível ([www.beecherinstruments.com](http://www.beecherinstruments.com)). Estes cilindros de tecido são retirados de regiões selecionadas do tumor do bloco doador usando uma agulha afiada e de paredes finas. A seleção destas áreas representativas é feita através das lâminas coradas pelo H&E referentes aos blocos doadores e posterior marcação destes blocos. A utilização de cilindros de 0,6mm de diâmetro permite preservação da informação histológica enquanto até 1000 espécimes podem ser amostrados em cada bloco recipiente. Uma fita adesiva pode ser usada na superfície do bloco de TMA para auxiliar na microtomia evitando que os cortes se abram e os discos de tecido se percam e permitindo a retirada de, no mínimo, 200 secções de 5 $\mu$  do bloco de TMA (Figura 1) (MOCH, 2001).



**Figura 1:** a) Retirada de um cilindro de tecido após a identificação da área representativa no bloco doador. b) Introdução do cilindro de tecido no bloco receptor. c) Colagem da fita adesiva no bloco de TMA, microtomia, e a retirada da fita após a secção estar fixa na lâmina. (KONONEN, 1998).



**Figura 2:** A) Seção do bloco de TMA contendo 532 cilindros de tecido de tumor renal corada pelo H&E. Discos de tecido corados pelo H&E morfologicamente preservados (B e C). D) Dois discos corados pela IIQ para vimentina. (MOCH, 1999).

## JUSTIFICATIVA

Após a revisão da literatura decidimos, no presente trabalho, empregar e aperfeiçoar um modelo alternativo de equipamento para a construção de *arrays* de tecido a partir de uma idéia inicial de um colega, Dr. Victor Piana Andrade e validá-lo na construção de *arrays* de tumores mamários. Propusemo-nos ainda a comparar a sensibilidade dos novos anticorpos monoclonais de coelho com anticorpos de camundongo na avaliação de RE e RP em carcinomas mamários.

## OBJETIVOS

- 1- Validar um modelo alternativo e de baixo custo para a construção de *arrays* de tecidos e os resultados de seu emprego para testar marcadores moleculares em carcinoma de mama empregando IIQ.
- 2- Comparar a sensibilidade dos novos anticorpos monoclonais de coelho com os anticorpos monoclonais de camundongo para avaliar RE e RP em carcinomas mamários invasivos através de IIQ.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A metodologia, resultados e conclusões serão apresentados como artigos científicos submetidos a periódico nacional e internacional.

Cada artigo está estruturado com base nas normas do periódico a que foi submetido. Os artigos possuem introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão e conclusões próprios.

**Artigo 1** - Construção de *arrays* de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imunoistoquímico de tumores mamários

**Submetido ao Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**

**Trabalho apresentado no XXV Congresso Brasileiro de Patologia, Natal, 10 a 14 de Outubro, 2005.**

Rocha, RM ; Andrade, VP ; Nunes, Cristiana Buzelin ; Rocha, GFS ; GOBBI, Helenice . Construção de arrays artesanais de tecido e de baixo custo para estudo imunoistoquímico (IHQ) de tumores mamários. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3, p. 51-51, 2005.

**Trabalho contemplado com o prêmio Osvaldo Giannotti Filho como melhor trabalho da área de Patologia Mamária apresentado no XXV Congresso Brasileiro de Patologia, Natal, 10 a 14 de Outubro, 2005.**

## **1. Título do artigo**

Construção de *arrays* de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imunohistoquímico de tumores mamários

Construction of low cost tissue microarrays using alternative equipment for immunohistochemical study of breast tumors

## **2. Nome dos autores**

Rafael Malagoli Rocha<sup>1</sup>; Victor Piana Andrade<sup>2</sup>; Cristiana Buzelin Nunes<sup>3</sup>; Gislene Fátima Silva Rocha<sup>4</sup>; Fernanda Squarcio Fernandes Sanches<sup>5</sup>; Flávio Nepomuceno Oliveira<sup>6</sup>; Helenice Gobbi<sup>7</sup>.

## **3. Titulação acadêmica dos autores e instituição com respectivos endereços**

1. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Patologia, UFMG.
2. Mestre em Patologia pela UFMG, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Hospital do Câncer de São Paulo, Assessor Médico do Instituto Fleury e do Hospital do Câncer de São Paulo.
3. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia, UFMG.
4. Bolsista de Iniciação Científica, CNPq.
5. Bolsista de Iniciação Científica, FAPEMIG.
6. Bolsista de Apoio Técnico do CNPq.
7. Professora Adjunto – Doutor do Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, MG.

## **4. Instituição onde o trabalho foi realizado**

Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Mamária, Faculdade de Medicina da UFMG.

## **5. Autor responsável pela correspondência e endereço para correspondência**

Rafael Malagoli Rocha

Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina - UFMG

Av. Alfredo Balena, 190, sala 5000

CEP: 30130-100 – Belo Horizonte – MG

## **6. Auxílio (agência de fomento)**

Trabalho realizado com apoio financeiro da FAPEMIG e CNPq.

## **8. Apresentação do trabalho em congresso**

Resultados parciais do trabalho foram apresentados no XXV Congresso Brasileiro de Patologia, Natal, RN, outubro de 2005. Resumo publicado no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (v. 41, p. 51). Trabalho recebeu prêmio Osvaldo Giannotti Filho, oferecido pela Escola Paulista de Medicina ao melhor trabalho em Patologia Mamária apresentado no congresso.

## **Construção de *arrays* de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imunoistoquímico de tumores mamários**

Construction of low cost tissue microarrays using alternative equipment for immunohistochemical study of breast tumors

Rocha RM; Andrade VP; Nunes CB; Rocha GFS; Sanches FAF; Oliveira FN; Gobbi H

### **Resumo**

**Introdução:** *Tissue microarrays* (TMA) são blocos contendo numerosos cilindros de tecido parafinado organizados em linhas e colunas que permitem analisar muitas amostras em única lâmina. Equipamentos disponíveis comercialmente são importados e têm alto custo (US\$ 11,000,00 a 24,000,00). **Objetivos:** Descrever uma forma alternativa de construção de *arrays* de tumores mamários, de baixo custo e nossa experiência na sua utilização em estudo imunoistoquímico (IIQ). **Metodologia:** Utilizou-se modelo que consiste numa mini-retífica com agulha de biópsia hepática de 2mm de diâmetro acoplada a bancada com suporte (Dremel®). Inicialmente preparou-se o bloco receptor fazendo o número de furos desejável (55). Cilindros de tecido foram obtidos com o mesmo dispositivo e colocados nos orifícios do bloco receptor. De cada bloco doador foram obtidos dois cilindros de diferentes áreas representativas do tumor. Em cada *array* foram incluídos cilindros

de tumor controle positivo e negativo para cada anticorpo testado na IIQ e cilindro marcador de iniciação da leitura da lâmina (fígado). Cortes seqüenciais de 4µm obtidos do *array* foram submetidos à IIQ. A primeira e última lâmina foram coradas pela hematoxilina e eosina (H&E) para avaliar: número de discos de tecido, preservação tecidual e adequidade da amostra. Foi realizada IIQ empregando anticorpos anti-receptores de estrógeno, progesterona, Ki67, p53 e Her2. Resultados: O custo total do equipamento foi U\$ 180,00. Cortes histológicos do *array* mostraram boa preservação tecidual, adequados para avaliação morfológica e suficientes para confirmação diagnóstica. A qualidade das reações IIQ foi semelhante à obtida nos blocos doadores. Conclusão: Este equipamento e técnica representam uma alternativa econômica aos equipamentos comerciais.

**Unitermos:** *array* de tecidos, câncer de mama, imunoistoquímica, marcadores prognósticos

### **Abstract**

Construction of low cost tissue microarrays using alternative equipment for immunohistochemical study of breast tumors

Background: Tissue microarrays (TMA) are blocks containing numerous cylinders of paraffinized tissue organized in lines and columns allowing analysis of numerous samples in one slide. Commercially available equipment is imported and have high cost (11,000,00 to 24,000,00 US dollars). Aim: we describe a low cost breast-

tumor TMA and our experience in its use for immunohistochemistry (IHC). Material and methods: A model that consists of a work station (Dremel®) to which a liver biopsy needle of 2mm of diameter was connected. A receptor block was prepared perforating it until the desired number of rows (55) was reached. Then, the cylinders of tissue were obtained using the same equipment and included in the holes of the receptor block. Two samples were obtained from different tumor areas of each donor block. Cylinders of previously tested positive control tumors for each antibody and one marker (liver sample) that indicated the beginning of slide reading were also included. IHC was performed in sequential 4µm sections from the same array using antibodies against estrogen and progesterone receptors, Ki67, p53, and Her2. The first and the last slides were stained by H&E to evaluate: number of tissue discs, tissue preservation, and adequacy of the tissue sample. Results: The equipment total cost was U\$ 180,00. The slides showed fine tissue preservation, adequate for morphologic evaluation, and sufficient to confirm diagnosis. The IHC quality was similar to the donor blocks. Conclusion: This equipment and technique represent an economical alternative when compared to commercial equipments.

**Keywords:** Tissue microarrays, breast cancer, immunohistochemistry

## Introdução

Por mais de um século, material de estudo tem sido preservado em formalina e embebido em parafina para microtomia e posterior análise. Este método se tornou o método padrão para análises histopatológicas <sup>(13)</sup>. Em 1998, pesquisadores criaram um mecanismo para examinar várias amostras de tecidos diferentes de uma só vez ao organizá-los num mesmo bloco de parafina empregando pequenos cilindros de tecido <sup>(7)</sup>. Estes *arrays* de tecidos foram referidos como *tissue microarrays* (TMA). Para a sua construção é empregado um aparelho no qual se utiliza uma agulha para retirar cilindros de tecidos incluídos em blocos de parafina pré-existentes (bloco doador) e rearranjá-los em um novo bloco (bloco receptor). Desta maneira, dezenas, e até centenas, de cilindros de tecidos podem ser colocados num único bloco de parafina. As lâminas obtidas pela microtomia deste bloco podem ser analisadas pela técnica rotineira da H&E ou por várias outras técnicas, incluindo a IIQ, hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e hibridação *in situ* cromogênica (CISH) <sup>(1, 6, 7, 9, 10, 11, 12)</sup>.

Para a construção do TMA convencional, o pesquisador estuda as lâminas originais e seleciona as áreas de interesse para o estudo. A seguir as áreas selecionadas são identificadas nos blocos de parafina arquivados (bloco doador) e um cilindro de tecido (que pode variar de 0,6mm a 2,0mm de diâmetro) é retirado desta área com uma agulha acoplada a um equipamento de precisão disponível comercialmente. Este cilindro é então introduzido em um novo bloco (bloco receptor). Os cilindros dos vários casos são sucessivamente adicionados ao bloco

receptor e a posição de cada caso é identificada em uma planilha com referências da coluna e linha. Ao final obtém-se um bloco receptor que pode conter até 1000 amostras diferentes.

Apesar da utilização de TMA estar amplamente validada pela literatura e seu uso cada dia mais difundido ainda há poucos modelos de equipamentos disponíveis comercialmente, manuais ou automáticos, e os preços variam entre US\$ 11,000,00 e US\$ 24,000,00 ([www.beecherinstruments.com](http://www.beecherinstruments.com)).

A potencialidade do emprego dos TMA para o estudo de marcadores prognósticos e preditivos em tumores mamários humanos nos motivou a montar e testar um equipamento alternativo e de baixo custo para construir *arrays* de carcinomas de mama e validar sua aplicação na avaliação de diferentes anticorpos. O objetivo deste trabalho foi divulgar o nosso modelo alternativo para a construção de *arrays* de tecidos e os resultados de seu emprego para testar os marcadores moleculares mais utilizados em carcinoma de mama empregando IIQ.

## **Material e método**

Foram selecionados 26 casos de carcinomas mamários invasivos (CMI) nos arquivos do Laboratório de Patologia Mamária do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG. As lâminas originais coradas pelo H&E foram revistas selecionando-se os respectivos blocos que apresentavam áreas mais representativas e preservadas do tumor.

Para a construção do TMA utilizou-se um dispositivo idealizado por um dos autores (Andrade VP) que consiste numa mini-retífica (motor giratório) acoplada a

uma bancada fixa com uma alavanca (Dremel<sup>®</sup>, Alemanha) (Fig. 1A) que permite à máquina subir e descer respeitando limites estipulados pelo manipulador. À mini-retífica foi encaixada uma agulha de biópsia hepática de 2mm de diâmetro e 1,5cm de comprimento cortada e lapidada utilizando lixas componentes do próprio equipamento. O custo total deste equipamento e acessórios no ano de realização do trabalho (2005) foi de R\$ 400,00 (U\$ 174,00).

A construção do TMA se iniciava com a confecção do bloco receptor. Primeiramente, um mapa para orientar o conteúdo dos orifícios foi elaborado em editor de texto, impresso em papel e fixado sobre a parafina amolecida do bloco receptor. Este mapa contém os pontos exatos onde a agulha giratória deve penetrar para a retirada do cilindro de parafina resultando na formação de um orifício para receber o cilindro de tecido tumoral obtido do bloco doador. Para este trabalho fez-se um bloco receptor contendo 55 orifícios organizados em 5 linhas e 11 colunas seguindo a orientação do mapa.

De cada uma das duas regiões marcadas em cada bloco de parafina doador foi retirado um cilindro de tecido que era encaixado seqüencialmente nos orifícios do bloco receptor. Para se retirar este cilindro, abaixava-se a alavanca do suporte fazendo com que a agulha giratória descesse, perfurasse o tecido e subisse novamente com o cilindro em seu interior. A profundidade da perfuração era controlada pela régua milimetrada da mini-retífica e mantida constante para todos os cilindros. A agulha era então retirada do suporte e, com o auxílio de um bastão internamente complementar ao diâmetro da agulha, o cilindro era retirado e encaixado no bloco receptor utilizando-se uma pinça (Fig 1B e 1C).

No *array* foi incluído também um cilindro de fígado (1º cilindro colocado na linha 1, coluna 1) para orientar o início da leitura e direcionamento das lâminas referido como cilindro iniciador de leitura. Portanto, cada *array* continha 55 cilindros sendo 52 cilindros representando 26 casos de tumores mamários em duplicata, dois cilindros de tumores previamente testados usados como controles positivos para os anticorpos a serem testados e um cilindro de fragmento hepático como marcador do início de leitura da lâmina.

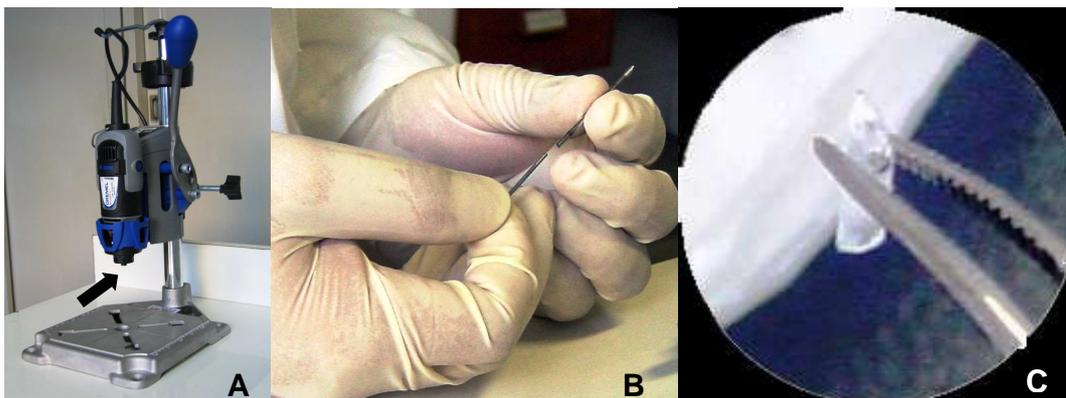
Cortes seriados foram obtidos de cada *array* até que o tecido de 30% dos cilindros não mais estivesse presente nas secções histológicas. As lâminas foram numeradas na ordem de retirada obtendo-se até 70 lâminas de cada bloco. As lâminas que possuíam maior quantidade de discos de tecido preservados e melhor organização das linhas e colunas foram selecionados para os testes IIQ. Para determinar a representatividade do TMA em relação aos blocos doadores, selecionamos áreas no bloco correspondentes a campos visuais que contivessem no mínimo 20% de tumor ao HE. <sup>(8)</sup>.

Anticorpos monoclonais anti-receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP), Her2, p53 e Ki67 foram empregados seguindo as recomendações dos fabricantes (Tabela 1). O método da estreptoavidina biotina peroxidase (Biogenex, EUA) foi o empregado para o estudo IIQ. Os cortes histológicos foram submetidos à recuperação antigênica usando tampão citrato em calor úmido, para RE, RP, p53 e Ki67 e sem reativação antigênica para as lâminas coradas pelo Her2. Fez-se revelação das reações com diaminobenzidina e contracoloração com hematoxilina de Harris.

**Tabela 1:** Anticorpos, clones, fabricantes e diluição empregados

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante
RE	6F11	1:100	Novocastra, UK
RP	PgR 312	1:100	Novocastra, UK
Ki67	MiB -1	1:100	Dakocytomation, EUA
p53	DO7	1:200	Dakocytomation, EUA
Her2	CB11	1:80	Novocastra, UK

As lâminas foram analisadas semi-quantitativamente, considerando-se positivas ou negativas segundo critérios da literatura <sup>(4)</sup>. A leitura das reações para RE, RP e p53 foi considerada positiva quando mais de 10% dos núcleos se coravam em marrom, independente da intensidade da reação. O critério de Melo e Alves (2002) que considera a porcentagem de marcação dos núcleos tumorais foi utilizado para avaliação do Ki67 como índice proliferativo baixo (0 a 10%), moderado (10 a 25%) e alto (acima de 25%) de núcleos tumorais marcados. A leitura do Her2 foi realizada empregando os critérios propostos no Herceptest<sup>®</sup> da Dakocytomation ([www.dako.com](http://www.dako.com)). As colorações obtidas nas secções histológicas dos *arrays* foram comparadas às colorações originais realizadas em secções obtidas do bloco doador correspondente a cada cilindro. A análise das colorações foi realizada por dois observadores (RMR e CBN) e as dúvidas ou discordâncias na leitura das reações foram revistas simultaneamente com um terceiro observador (HG) em um microscópio de múltiplos observadores chegando-se a uma leitura de consenso.



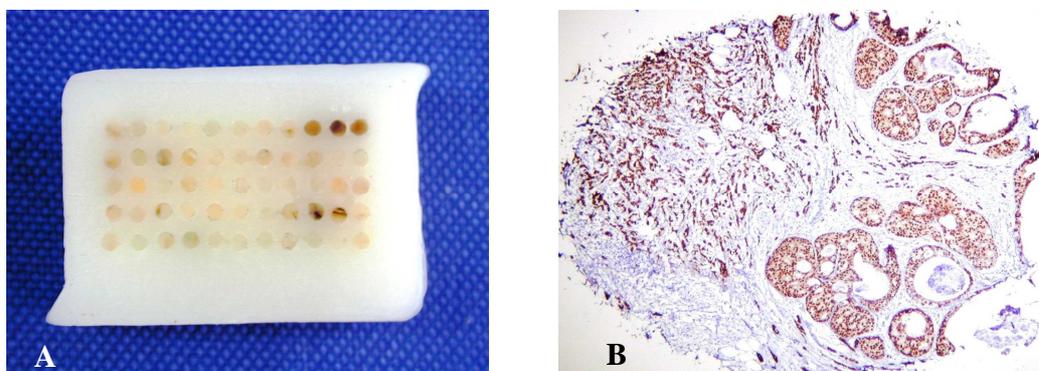
**Figura 1:** *Mini-retífica acoplada a uma bancada fixa com uria alavanca (Dremel<sup>®</sup>, Alemanha). Local de encaixe da agulha de biópsia hepática (seta) (A). Retirada do cilindro de tecido parafinizado do interior da agulha que acaba de ser retirado do bloco doador, utilizando-se um bastão internamente complementar ao diâmetro da agulha (B). Cilindro proveniente do bloco doador sendo conduzido com uma pinça ao seu orifício no bloco receptor (C).*

## Resultados

O tempo médio gasto para a construção do *array* com 55 cilindros de 2mm de tecido cada foi de 50 minutos (Fig 2A). De cada bloco de TMA foram obtidos 26 cortes histológicos seriados de 4 $\mu$ m de espessura medindo 2,5 por 1,3cm. As lâminas inicial e final foram coradas pela H&E. A análise macroscópica das lâminas revelou perda de 1 cilindro durante a microtomia, após o décimo primeiro corte. Como de cada caso foram incluídos 2 cilindros de tecido pôde-se analisar o outro cilindro do mesmo caso que estava presente em todas as lâminas. A qualidade da coloração avaliada pela H&E mostrou que todos os cilindros apresentaram boa preservação tecidual suficiente para confirmação diagnóstica. Na lâmina inicial faltaram 10 discos e na lâmina final faltaram 7. As reações IIQ

nas lâminas dos *arrays* apresentaram qualidade semelhante à obtida nas colorações anteriormente realizadas no corte histológico integral dos blocos doadores (figura 2B).

Nas lâminas submetidas à IIQ houve maior perda de discos naquelas submetidas à recuperação antigênica (RE, RP, p53 e Ki-67). A maior perda foi de 10/55 discos, na lâmina corada para p53 e a menor foi de 2 discos na lâmina corada para RP.



**Figura 2** - Bloco receptor deste modelo artesanal de TMA completo com 55 cilindros(A). Corte de um cilindro (um disco) em aumento de 10X corado pela IIQ com anticorpo anti RE, clone 6F11 da Biogenex® (B).

## Discussão

No presente trabalho, descrevemos um modelo alternativo de equipamento para construção de *arrays* de tecidos. Nosso equipamento custou cerca de US\$ 180,00 referentes ao valor da mini-retífica, bancada e acessórios. O custo dos equipamentos manuais comercialmente disponíveis pode variar entre US\$ 12, 000,00 e US\$ 24, 000,00. A este valor deve ser acrescido o custo de US\$ 200,00

referente às agulhas de 2mm que são vendidas em jogos com 10 unidades ([www.beecherinstruments.com](http://www.beecherinstruments.com)).

O tempo gasto na construção do *array* foi relativamente curto (aproximadamente 50 minutos). No entanto, o tempo gasto na análise das lâminas dos *arrays* foi maior embora o trabalho de se analisar uma circunferência de tecido do TMA seja praticamente o mesmo de se analisar um *hot spot* de um corte convencional. Para a análise dos 55 cilindros do *array* é necessário um esforço de concentração maior para seguir a seqüência das linhas e colunas a partir do disco de iniciação de leitura da lâmina.

A microtomia do bloco de TMA também representou maior dificuldade que cortar um bloco de parafina contendo um ou dois fragmentos de tecido. Ao se colocar a fatia de parafina com os cilindros de tecido no banho maria histológico para se distender o material, o corte tendia a abrir desorganizando as linhas e colunas. Este problema, em geral, não ocorre ou é minimizado quando se usa a fita adesiva vendida como acessório dos equipamentos disponíveis comercialmente. A fita adesiva facilita manter a ordenação dos discos no TMA. Observamos também perda de discos de tecido durante a técnica de IIQ mesmo utilizando lâminas silanizadas para aumentar sua adesão ao tecido.

As bordas de nossos discos de tecido ficaram lisas e uniformes, pois as agulhas foram previamente bem lapidadas utilizando-se as lixas que são adquiridas junto com o equipamento que utilizamos. Dentre os acessórios disponíveis comercialmente estão jogos de agulhas descartáveis, de diferentes calibres, que são substituídos à medida que o gume fica gasto. O custo, no entanto, é bem maior que o nosso material alternativo, pois utilizamos agulhas de

biópsia hepática reaproveitadas após seu uso clínico.  
([www.beecherinstruments.com](http://www.beecherinstruments.com)).

As informações sobre a representatividade do tecido amostrado no TMA com relação ao tecido original é variável e depende do diâmetro do cilindro e quantos cilindros são inseridos no TMA. Não há uma norma geral na literatura sobre quantos cilindros representam o tumor original.

Camp et al (2000) construíram um *array*, utilizando equipamento convencional, com 10 cilindros de tecido, de 0,6mm cada, de cada caso de neoplasia mamária invasora e as áreas foram selecionadas quando, no mínimo, 10% da circunferência era constituído pelo tumor. Estes autores observaram que, na análise dos receptores de estrógeno e do HER2 *neu*, em apenas um caso não houve concordância entre o *array* e o bloco original. Outro trabalho relata a construção de *arrays* com cinco cilindros de 0,6mm de diâmetro representativos de cada caso <sup>(5)</sup>.

O TMA artesanal que descrevemos apresentou boa representatividade tecidual em relação aos blocos doadores tanto no resultado IIQ quanto no diagnóstico pela H&E. Apesar de termos utilizado apenas dois cilindros representando cada tumor, obtivemos áreas representativas tanto para confirmação diagnóstica pela H&E quanto para avaliação IIQ com resultados equivalentes aos obtidos dos blocos doadores. Semelhante ao nosso trabalho, outros autores obtiveram representatividade de até 95% com dois cilindros de 0,6mm utilizando *arrayers* comercialmente disponíveis <sup>(2)</sup>.

Em conclusão, o equipamento e técnica de construção do *array* que descrevemos representam uma alternativa econômica aos equipamentos

comerciais para construção de *arrays* de tecido e permitem boa concordância diagnóstica com os cortes de blocos originais corados pela H&E e no estudo IIQ de marcadores prognósticos em tumores mamários.

## **Agradecimentos**

Trabalho realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referências bibliográficas

1. Bubendorf, L. *et al.* Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J Natl Cancer Inst*, v.91, n.20, Oct 20, p.1758-64. 1999.
2. Camp, R. L. *et al.* Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, v.80, n.12, Dec, p.1943-9. 2000.
3. Ferreira, J. E. *et al.* [Non-functioning pituitary adenomas: clinical features and immunohistochemistry]. *Arq Neuropsiquiatr*, v.63, n.4, Dec, p.1070-8. 2005.
4. Fitzgibbons, P. L. *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, v.124, n.7, Jul, p.966-78. 2000.
5. Gulmann, C. *et al.* Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. *Histopathology*, v.42, n.1, Jan, p.70-6. 2003.
6. Hoos, A. e C. Cordon-Cardo. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest*, v.81, n.10, Oct, p.1331-8. 2001.
7. Kononen, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, v.4, n.7, Jul, p.844-7. 1998.
8. Layfield, L. *et al.* Tissue heterogeneity of immunohistochemically detected estrogen receptor. Implications for image analysis quantification. *Am J Clin Pathol*, v.110, n.6, Dec, p.758-64. 1998.
9. Moch, H. *et al.* Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol*, v.8, n.1, Jan, p.14-20. 2001.
10. Mucci, N. R. *et al.* Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol*, v.31, n.4, Apr, p.406-14. 2000.
11. Perrone, E. E. *et al.* Tissue microarray assessment of prostate cancer tumor proliferation in African- American and white men. *J Natl Cancer Inst*, v.92, n.11, Jun 7, p.937-9. 2000.
12. Schraml, P. *et al.* Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res*, v.5, n.8, Aug, p.1966-75. 1999.

13. Wright, J. R., Jr. The development of the frozen section technique, the evolution of surgical biopsy, and the origins of surgical pathology. *Bull Hist Med*, v.59, n.3, Fall, p.295-326. 1985.

**Artigo 2** - Rabbit monoclonal antibodies are highly sensitive and a reliable alternative for estrogen and progesterone receptor evaluation in breast cancers by immunohistochemistry compared to mouse monoclonal antibodies

**Submetido ao American Journal Clinical Pathology**

**Resultados parciais deste trabalho foram apresentados no:**

**1) 95th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology, Atlanta – Georgia/USA.**

GOBBI, Helenice ; Nunes, Cristiana Buzelin ; Rocha, RM ; Rocha, GFS ; Sanches, FSF ; Oliveira, FN ; Andrade, VP . A Comparative Study Between New Rabbit Monoclonal Antibodies and Mouse Monoclonal Antibodies Anti-Estrogen Receptor in Breast Cancer. Laboratory Investigation, ATLANTA / GEORGIA / EUA, v. 86, n. 1, p. 28A-28A, 2006.

**2) XXV Congresso Brasileiro de Patologia, Natal, 10 a 14 de Outubro, 2005.**

Nunes, Cristiana Buzelin ; Rocha, RM ; Rocha, GFS ; Sanches, FSF ; Andrade, VP ; Oliveira, FN ; Heras, A ; GOBBI, Helenice . Estudo imunoistoquímico (IHQ) comparativo entre novos anticorpos monoclonais de coelho (RABMAB) e anticorpos de camundongos para receptor de estrógeno em array de carcinomas mamários invasores (CMI). Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3, p. 44-44, 2005.

Rabbit monoclonal antibodies are highly sensitive and a reliable alternative compared to mouse antibodies for estrogen and progesterone receptor evaluation in breast cancers by immunohistochemistry

### **Abstract**

Immunohistochemistry analysis (IHC) for estrogen and progesterone receptors (ER and PR) in breast cancer is a well established predictive factor of anti-estrogen therapy. However, there is a large and variable choice of antibodies and no recommendation about the best antibodies to be used in clinical and research testing. A novel generation of rabbit monoclonal antibodies (RabMab) has been released recently. In this study, we compared the novel RabMab anti-ER and anti-PR antibodies to the mouse monoclonal antibodies (Mab) using a tissue microarray. Two cylinders (2mm diameter) of formalin-fixed paraffin embedded tissue were obtained from 24 invasive breast cancers and immunostained using anti-ER Mab (1D5 and 6F11) and RabMab (SP1 and B644), and anti-PR Mab (PgR312 and PgR636) and RabMab (SP2 and B645). The IHC was evaluated considering positive those tumors in which more than 10% of the tumor cell nuclei stained. We also semiquantitatively evaluated staining intensity and background. Our results showed that both RabMab against ER and PR from two different suppliers presented higher sensitivity compared to the Mab. The novel RabMab are highly sensitive, reliable and represent a good alternative for ER and PR testing by IHC in formalin-fixed paraffin embedded tissue.

## Introduction

A new age of molecular medicine has been developed, new genes have been described and their proteins have been characterized. New drugs have been developed from specific proteins, blocking or changing molecular pathways leading to the regression of the disease <sup>(30)</sup>. Since 1990, pathology has played an important role in this new world of molecular medicine: it is expected from pathology not only the correct diagnosis but more information about prognostic and predictive molecular markers aiming the best breast cancer treatment <sup>(30)</sup>.

Although predictive factors of therapy response have more clinical value, the only broadened validated predictive factors for the routine clinic use are estrogen (ER) and progesterone (PR) hormone receptors <sup>(3)</sup>. Recently, scientists have been evaluating ER and PR almost only by IHC after the release of the monoclonal antibodies (Mab). The great advantage of the Mabs is that they can be applied to formalin-fixed, paraffin-embedded tissues <sup>(2, 7, 9, 26, 34)</sup>. There is a large variety of methods and different clones used for ER and PR testing through IHC in the laboratory's routine and, as a result, there isn't still a standard universally accepted <sup>(20, 31)</sup>. As any other laboratory method, its details have a great effect in the final testing result <sup>(13, 28, 29)</sup>.

European and American studies show large variation in the results of ER and PR evaluation <sup>(27, 29, 33)</sup>. An important point is the choice of the primary antibody <sup>(27, 36)</sup>. New antibodies are released every year due to new studies. Although very useful in routine and in random clinic tests, there is no recommendation in the literature about which antibodies would be more specific and sensitive for

evaluating ER and PR by IHC <sup>(7, 9)</sup>. However, the choice of the best primary antibody has a great importance in the final results of the IHC testing which can influence treatment decisions <sup>(29)</sup>.

The most used antibodies for ER and PR evaluation by IHC have been the mouse monoclonal antibodies (Mab). Recently, a new generation of rabbit monoclonal antibodies (RabMab) has been developed <sup>(18)</sup>. The technology to prepare these antibodies coming from a single hybridoma allows producing antibodies with high sensitivity and specificity, high working dilutions and better cost versus benefits. According to the suppliers the novel RabMab could replace the classic Mab because their high specificity and lower cost and faster technical procedure for not requiring the antigen retrieval step <sup>(6, 18, 32)</sup>.

In the present study we compared the sensitivity of the novel rabbit monoclonal antibodies with the classic mouse monoclonal antibodies to evaluate ER and PR in invasive breast carcinomas by IHC.

## **Methods**

### Case Selection

Twenty four cases of invasive breast carcinomas were randomly selected from the files of the Breast Pathology Laboratory of School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil, diagnosed between 1990 and 2005. All original slides were reviewed to confirm the diagnosis and to select representative areas of tumors. Two cylinders (2mm diameter) of each tumor with representative areas of neoplasia were selected from paraffin blocks to build the tissue microarray (TMA).

Two cylinders of tumor from previously tested positive and negative tumors were also included as internal control of TMA. Sequential 5µm sections were obtained and stained for hematoxylin and eosin (first and last sections) to confirm diagnosis and the interval sections were used for the immunohistochemical (IHC) study. Slides containing sections of a positive breast tumor were included in all batches as external control.

### Immunohistochemical Study

All immunohistochemical stainings were manually processed.

### Estrogen Receptor

Classic mouse monoclonal antibodies (Mab) and rabbit monoclonal antibodies were used in order to evaluate estrogen receptor (Table 1). All sections were initially submitted to heating induced epitope retrieval using citrate buffer (pH 6.0). The streptoavidin-biotin method was used (Biogenex, USA) and the reactions revealed with diaminobenzidin. Harris hematoxylin was used for counter staining.

### Progesterone Receptor

The rabbit and mouse monoclonal antibodies used, working dilutions, and suppliers are list in Table 1. The tissue sections were submitted to the same staining protocol described for ER.

Table 1 – Antibodies, clones, dilutions, and suppliers of the rabbit and mouse monoclonal antibodies against estrogen and progesterone receptors

<b>Antibody</b>			
<b>Mouse monoclonal</b>	<b>Clone</b>	<b>Dilution</b>	<b>Supplier</b>
Estrogen Receptor	1D5	1:100	Dakocytomation, USA
Estrogen Receptor	1D5	1:100	BioSB, USA
Estrogen Receptor	1D5	1:100	Biogenex, USA
Estrogen Receptor	6F11	1:100	Novocastra, UK
Progesterone Receptor	PgR 312	1:100	Novocastra, UK
Progesterone Receptor	PgR 636	1:100	Dakocytomation, USA
<b>Rabbit monoclonal</b>			
Estrogen Receptor	SP1	1:300	Lab Vision, USA
Estrogen Receptor	B644	1:300	BioSB, USA
Progesterone Receptor	SP2	1:300	Lab Vision, USA
Progesterone Receptor	B645	1:300	BioSB, USA

## Immunostaining Analysis

All sections submitted to IHC were coded and then double-blinded analyzed and scored by the same examiner without knowledge of the antibody used. The cut offs accepted in the literature <sup>(9, 10, 11)</sup>. We considered positive those tumors containing more than 10% of stained nuclei, independently of the staining intensity. The strongest staining hot spot of the two discs of each tumor was considered in the analysis. The intensity of the reaction and the background was also evaluated as negative (0), and positive: weak (1); moderate (2), and strong (3).

## Statistical Analysis

The Wilcoxon test was used in the comparative statistical analysis of the different antibodies positivity and the Coefficient of Spearman was used to evaluate if there was a positive correlation among the different antibodies.

## **Results**

### Estrogen Receptor Analysis

The score obtained in each case using the six different antibodies are shown in Table 1 and Fig 1. The estrogen receptor was positive in 15 cases (62.5%), with variable staining intensity among the different cases and antibodies used. In one case (case 17), there was no variation in the intensity of staining using the different clones, and tumor cells showed strong reactivity. In 5 cases there were positive reactions for some antibodies (including both RabMabs) and

negative reactions for other antibodies (cases 7, 9, 13, 18, 21). In all these five cases the reaction was negative for 1D5 (Biogenex). Cases 9 and 21 were negative for 1D5 from three suppliers and positive for the RabMabs and for the Mab 6F11. Nine cases (37.5%) were negative for all antibodies tested.

There was a statistic significant difference when comparing the clone 1D5 from different suppliers to both RabMabs which stained stronger ( $p < 0.05$ ). However, no difference was observed between the stains of both RabMabs and Mab 6F11. A statistical significant difference was observed when comparing all the antibodies to the clone 1D5 (Biogenex), which showed weaker reactions than the other antibodies ( $p < 0.02$ ).

The highest agreement was obtained among the two rabbit clones (SP1 and B644) and the mouse clone 6F11 which showed stronger nuclear staining compared to the other mouse antibodies in the majority of cases (Fig. 1).

There was no difference in the staining intensity regarding the time of storage of the paraffin blocks that ranged from 1990 to 2005.

**Table 2.** Evaluation of estrogen receptor in 24 breast cancers using rabbit monoclonal antibodies (SP1 and B644) and mouse monoclonal antibodies (6F11 and 1D5 from three different suppliers).

Case	Antibody type					
	Rabbit		Mouse			6F11
	SP1	B644	1D5			
			Dako	BioSB	Biogenex	
1	1	2	2	1	1	3
2	2	1	1	1	2	2
3	0	0	0	0	0	0
4	3	2	2	2	2	3
5	0	0	0	0	0	0
6	3	3	2	3	1	3
7	2	2	1	1	0	2
8	3	3	3	3	2	3
9	2	2	0	0	0	2
10	3	3	3	3	2	3
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	2	2	1	2	0	1
14	0	0	0	0	0	0
15	3	3	3	3	1	3
16	3	3	3	3	2	3
17	3	3	3	3	3	3
18	3	3	1	1	0	2
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
21	1	1	0	0	0	1
22	0	0	0	0	0	0
23	3	3	2	3	2	3
24	0	0	0	0	0	0

The numbers indicate intensity of staining, ranging from negative = 0; and positive: weak = 1, moderate = 2, and strong = 3.

## Progesterone Receptor Analysis

In 16 cases (66.7%) there was more than 10% of positive cells and these cases were considered positive. In 8/16 cases there was no variation in the intensity of the staining using the different clones (cases 2, 4, 6, 8, 10, 16, 17, and 23). In 4 cases there were positive reactions for RabMabs (SP2 and B645) and negative for Mabs (PgR 312 and PgR636), (cases 3, 7, 9, 14). Case 7 was positive for both RabMabs and negative for both Mabs. Eight cases (33.4%) were negative for all antibodies tested. Two cases were negative for ER and positive for PR (3, 14) and one case was negative for PR and positive for ER (21)

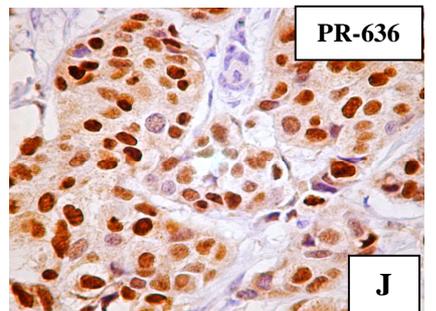
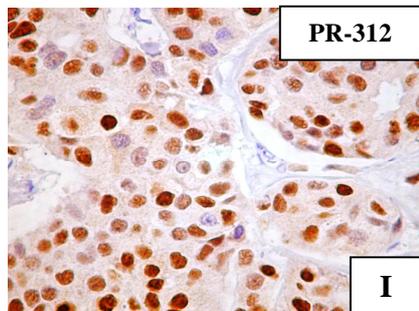
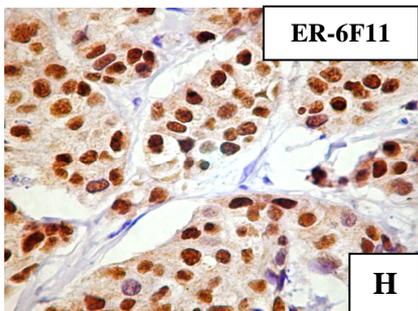
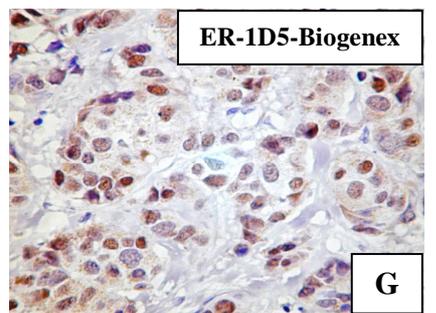
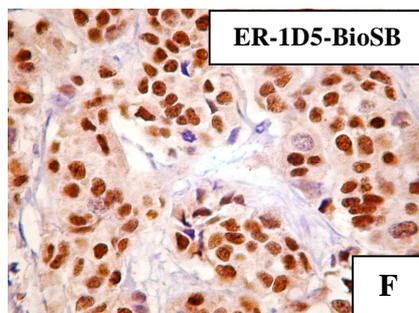
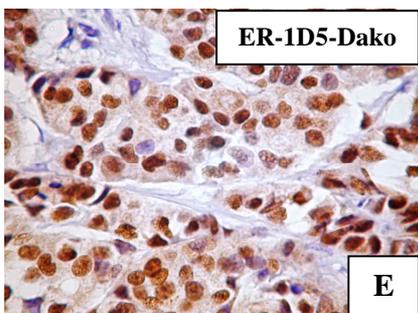
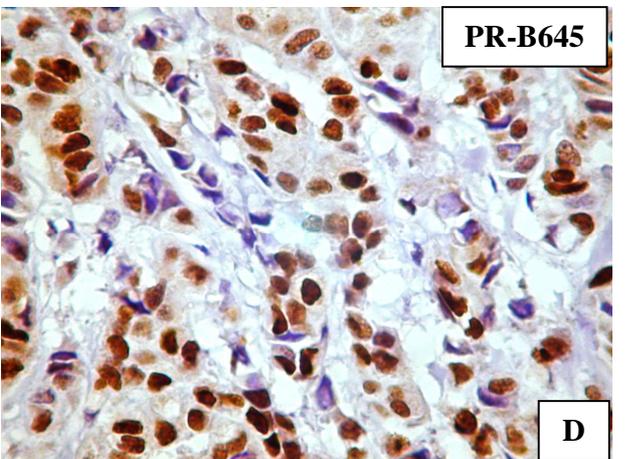
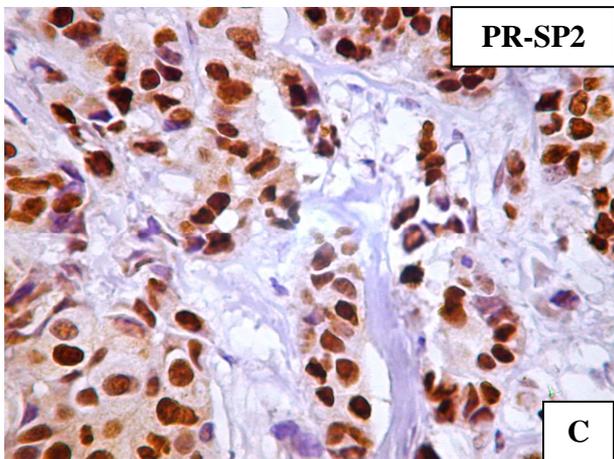
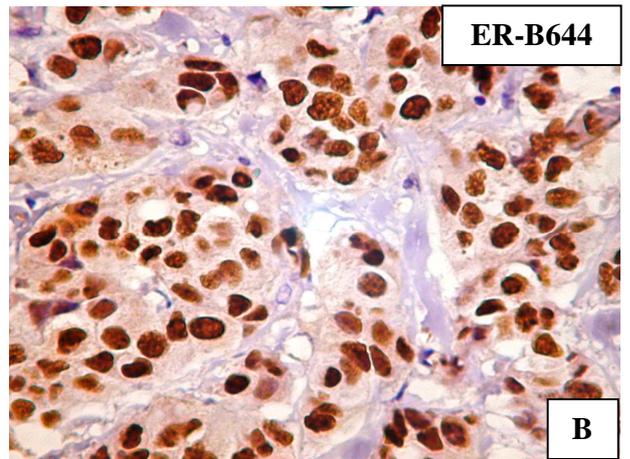
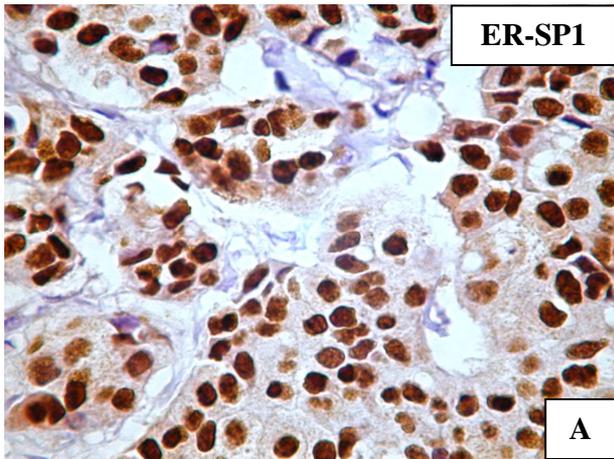
Sections stained for both RabMab SP2 and B645 showed significant stronger staining intensity than those stained for both Mab antibodies ( $p=0.025$ ).

There was a statistically significant agreement between the estrogen and progesterone receptor positivity and negativity in the same cases ( $p=0.001$ ).

**Table 3.** Evaluation of progesterone receptor in 24 breast cancers using rabbit monoclonal antibodies (SP2 and B645) and mouse monoclonal antibodies (PGR312 and PGR636)

Case	Antibody type			
	Rabbit		Mouse	
	SP2	B645	PgR 312	PgR 636
1	1	3	2	2
2	2	2	2	2
3	0	1	0	0
4	2	2	2	2
5	0	0	0	0
6	3	3	3	3
7	1	1	0	0
8	3	3	3	3
9	1	0	0	0
10	3	3	3	3
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	2	3	3	3
14	0	1	0	0
15	2	3	3	3
16	3	3	3	3
17	3	3	3	3
18	2	2	1	1
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	3	3	3	3
24	0	0	0	0

The numbers represent intensity of staining ranging from negative = 0; and positive: weak = 1, moderate = 2, and strong = 3.



**Figure 1:** Estrogen receptor: RabMab SP1 (A) and B644 (B) show stronger staining intensity compared to Mab 1D5 from three different suppliers (E, Dako; F, BioSB; and G, Biogenex) and similar staining intensity to Mab 6F11 (H). Sections stained for 1D5 (Biogenex) (G) showed weaker staining intensity compared to all other anti-ER antibodies. RabMab SP2 (C) and B645 (D) show similar staining intensity, stronger than sections stained for Mab (I, PgR312; and J, PgR636).

## **Discussion**

In the present study, we compared mouse monoclonal antibodies and novel rabbit monoclonal antibodies for ER and PR testing in breast carcinomas using TMA and the immunohistochemical method. There are few other studies in the literature comparing the new rabbit monoclonal antibodies with mouse antibodies<sup>(6, 32)</sup>. Cano et al<sup>(6)</sup> also evaluated estrogen and progesterone receptors in fine-needle aspirates and paraffin-embedded sections from breast cancers using SP1 and SP2 rabbit antibodies. They found that the use of rabbit monoclonal antibodies against ER and PR on alcohol-fixed smears and paraffin sections provide several advantages, such as high sensitivity and specificity of the reaction, stronger immunostaining, shorter procedure times, and avoidance of antigen retrieval step. Rossi et al<sup>(32)</sup> carried out a comparative study between RabMab clones against estrogen and progesterone receptors, Ki67, cyclin D1, CD3, CD5, CD23, and synaptophysin and classic mouse monoclonal antibodies against the same antigens on several tumor types as well as normal tissues. They found no significant differences in the percentage of positive cells and staining intensity.

However, RabMabs appear to offer increased sensitivity with no apparent loss of specificity and also allowed a higher working dilution. Cheuk et al compared the novel RabMab anticyclin D1 antibodies to mouse antibodies against cyclinD1 and confirmed the superior performance of the rabbit SP4. A consistent immunostaining for cyclin D1 was readily achieved when compared to mouse antibody DCS-6 in 150 cases of lymphoproliferative lesions <sup>(8)</sup>.

In our study, we also used a semiquantitative evaluation of the intensity of staining trying to detect differences of sensitivity among the different antibodies. We found that both ER RabMabs stained with stronger intensity compared to the 1D5-Mab from different suppliers but with similar intensity to the 6F11. The 1D5 (Biogenex) was responsible for a significant number of negative results (4 cases) that were positive when stained with the other antibodies.

Many studies reported their results of ER and PR analysis based on a semiquantitative method considering both intensity and percentage of nuclei immunopositive. The intensity of staining is excluded, as it has been noted no relationship to therapy response or prognosis <sup>(2, 15, 25, 37)</sup>.

One of the advantages of RabMab is that the epitope retrieval step would not be necessary making shorter the total time to run the reaction. However, pretests performed in our laboratory showed that with no epitope retrieval the rabbit antibodies working dilution was 1:50 and using epitope retrieval was 1:300. Although the antigen retrieval step is more time consuming, the total cost of each test can be reduced using antibody dilutions 6 times less concentrated. Rossi et al <sup>(32)</sup> used the RabMab SP1 10 times less concentrated than the 6F11 using antigen retrieval. These authors also described that acceptable staining was obtained with

SP1 even in the absence of antigen retrieval, a condition in which 6F11 sensitivity dropped dramatically <sup>(32)</sup>. According to Huang et al <sup>(18)</sup> the high affinity of the clone SP1 and its bindings to a different epitope from clone 1D5 would explain why the antigen retrieval is not necessary. The RabMab SP1 has appropriate tissue reactivity, with nuclear staining in epithelial tissues of known ER status showing an affinity 8 times higher than that of 1D5 and reactivity with the predicted band on western blotting <sup>(19)</sup>.

Huang et al <sup>(19)</sup> also demonstrated that the RabMab SP1, against ER, showed similar results to Mab clone 1D5, except in 6 out of 61 samples. According to the authors, the clone SP1 may be more sensitive than clone 1D5 and has the same specificity as clone 1D5 in IHC <sup>(19)</sup>.

There are few studies comparing different mouse clones against PR and to our knowledge there are no other studies comparing rabbit and mouse clones anti-PR. In our study, we found a significant better staining for the RabMab clones SP2 and B645 compared to the Mabs PgR636 and PgR312. There was a concordance between ER and PR staining in the positive cases, however we observed that PR antibodies stained with stronger intensity than ER in the same cases. In our study, clear background and a sharp nuclear staining was observed in all sections stained for the RabMabs against ER and PR (Fig. 1) and may reflect the high specificity of the monoclonal antibodies, especially the RabMabs, whose reactions showed the clearest background.

In summary, the new RabMabs against ER (SP1 and B644) and PR (SP2 and B645) are highly sensitive and reliable in IHC testing of breast carcinomas. Our results demonstrate that RabMabs against ER have similar staining pattern

compared to the 6F11 Mab but better than clone 1D5 from three different suppliers. The RabMabs against PR (SP2 and B645) provide stronger and sharper IHC signal and clearer background compared to mouse antibodies (Pgr636 and PgR312). Both ER and PR RabMabs allow better cost benefit because of higher working dilution compared to Mab.

## References

1. Allred DC, Harvey JN, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998;11:155-168.
2. Anderson J, Poulsen HS. Immunohistochemical estrogen receptor determination in paraffin-embedded tissue: prediction of response to hormonal treatment in advanced breast cancer. *Cancer* 1989;64:1901-8.
3. Barnes DM, Harris WH, Smith P, et al. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *Br J Cancer.* 1996;74:1445-1451.
4. Barnes DM, Millis RR, Beex LV, et al. Increased use of immunohistochemistry for oestrogen receptor measurement in mammary carcinoma: the need for quality assurance. *Eur J Cancer.* 1998;34:1677-1682.
5. Camp RL, Charaette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest.* 2000;80:1943-49.
6. Cano G, Milanezi F, Leitao D, et al. Estimation of hormone receptor status in fine-needle aspirates and paraffin-embedded sections from breast cancer using the novel rabbit monoclonal antibodies SP1 and SP2. *Diagn Cytopathol.* 2003;29(4):207-211.
7. Chebil G, Bendahl P, Fernö M. Estrogen and progesterone receptor assay in paraffin-embedded breast cancer – reproducibility of assessment. *Acta Oncol.* 2003;42(1):43-47.
8. Cheuk W, Wong KO, Wong CS, et al. Consistent immunostaining for cyclin D1 can be achieved on a routine basis using a newly available rabbit monoclonal antibody. *Am J Clin Pathol.* 2004;28(6):801-807.
9. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol La. Med.* 2000;124:966-978.
10. Gobbi H, Arteaga Cl, Jensen Ra, et al. Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumor grade in human breast in situ and invasive carcinomas. *Histopathology.* 2000;36(2):168-177.

11. Gobbi H, Dupont WD, Parl FF, et al. Breast Cancer risk associated with estrogen receptor expression in epithelial hyperplasia lacking atypia and adjacent lobular units. *Int J Cancer*. 2005;113:857-859.
12. Goulding H, Pinder S, Cannon P, et al. A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. *Hum Pathol*. 1995;26:291-294.
13. Gouvêa AP, Fernandes, JRM, Olson, SJ, et al. Her-2/ neu immunoreactivity in invasive mammary carcinomas: a comparative study using monoclonal and polyclonal antibodies including the Herceptest. *J Bras Patol*. 2004;40(1):47-52.
14. Hammond MEH, Barker P, Taube S, et al. Report of a national institute of standards and technology sponsored consensus workshop. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003;11:103-106.
15. Hanna W, McReady DR, Chapman JW, et al. The predictive value of ERICA in breast cancer recurrence: a Univariate and multivariate analysis. *Mod Pathol*. 1993;6:748-754.
16. Harvey JN, Clark GM, Osborne CK, et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17:1474-1481.
17. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest*. 2001;81(10):1331-1338.
18. Huang Z, Zhu W, Meng Y. Novel rabbit monoclonal antibody to estrogen receptor (clone SP1): no heat pretreatment but effective on paraffin embedded tissue. (in press). *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005.
19. Huang Z, Zhu W, Szekeres G, et al. Development of new rabbit monoclonal antibody to estrogen receptor. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005;13:91-95.
20. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, et al. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1054-1059.
21. Kobayashi S, Ito Y, Ando Y, et al. Comparison of five different antibodies in the immunohistochemical assay of estrogen receptor alpha in human breast cancer. *Breast Cancer*. 2000;7:136-141.

22. Koenders A, Thorpe SM on behalf of the EORTC Receptor group. Standardisation of steroid receptor assays in human breast cancer-IV. Long-term within-and between-laboratory variation of estrogen and progesterone receptor assays. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1986;22:945-952.
23. Moskaluk CA. Standardisation of clinical immunohistochemistry: Why, how and by whom? *Am J Clin Pathol*. 2002;118(5):669-671.
24. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Br Cancer Res Treat*. 1998;51:195-208.
25. Pellicer EM, Sundblad A. Evaluation antibodies to estrogen receptors. *Appl Immunohistochem*. 1994;2:141.
26. Pertschuk LP, Feldman JG, Kim Y-D, et al. Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embedded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accurately than H222Sp gamma in frozen sections or cytosol-based ligand-binding assays. *Cancer*. 1996;77:2514-2519.
27. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, et al. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: inter-laboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol*. 2000;53:125.
28. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, et al. Immunohistochemical demonstration of oestrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on 'in house' tumours with that achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries. *J Clin Pathol*. 2000;53:292.
29. Rhodes A, Jasani B, Balaton, AJ, et al. Study of interlaboratory reliability and reproducibility of estrogen and progesterone receptor assays in Europe: documentation of poor reliability and identification of insufficient microwave antigen retrieval time as a major contributory element of unreliable assays. *Am J Clin Pathol*. 2001;115: 44.
30. Rhodes A, Jasani B, Anderson E et al. Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin fixed and paraffin processed cell lines and breast tumours: a comparative study involving results from laboratories in 21 countries. *Am J Clin Pathol*. 2002;118:408-417.
31. Romain S, Laine Bidron C, Martin PM, et al on behalf of the EORTC Receptor Study Group. EORTC Receptor Study Group Report: steroid receptor distribution in 47, 892 breast cancers. A collaborative study of 7 European laboratories. *Eur J Cancer*. 1995;31A:411-417.

32. Rossi S, Laurino L, Furlanetto A, et al. A comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(2):295-302.
33. Rüdiger T, Höfler H, Kreipe HH, et al. Quality assurance in immunohistochemistry: results of an interlaboratory trial involving 172 pathologists. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(7):873-882.
34. Sannino P, Shousha S. Demonstration of estrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. *J Clin Pathol.* 1994;47:90-92.
35. Sauter G, Mirlacher M. Tissue microarrays for predictive molecular pathology. *J Clin Pathol.* 2002;55(8):575-576.
36. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:1204-1207.
37. Stierer M, Rosen H, Weber R. Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer: correlation of histopathology and prognostic factors. *Ann Surg.* 1993;218:13-21.
38. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours Tumours of the Breast and Female Genital Organs. 2003.
39. Taylor CR. An exultation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. *Human Pathol.* 1994;25:2-11.
40. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, et al. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol.* 2001;19:2714.
41. van Diest PJ, Weger DR, Lindholm J. Reproducibility of subjective immunoscore of steroid receptors in breast cancer. *Anal Quant Cytol Histol.* 1996;18:351-354.
42. Vassallo J, Pinto GA, Alvarenga M, et al. Comparison of immunoexpression of 2 antibodies for estrogen receptors (1D5 and 6F11) in breast carcinomas using different antigen retrieval and detection methods. *Appl Immunohistochem.* 2004;12:177-182.
43. Wick MR, Swanson PE. Editorial: Targeted controls in clinical immunohistochemistry; a useful approach to quality assurance. *Am J Clin Pathol.* 2002;117:7.

## CONCLUSÕES GERAIS

- 1- O equipamento e técnica de construção do *array* representam uma alternativa econômica, confiável e útil aos equipamentos comerciais para a construção de *arrays* de tecido com boa concordância diagnóstica com os blocos doadores tanto na avaliação histológica pelo H&E quanto no estudo IIQ de marcadores moleculares em tumores mamários.
- 2- Os novos anticorpos monoclonais de coelho contra RE (SP1 e B644) e RP (SP2 e B645) são mais sensíveis que o Mab 1D5 e os Mabs contra RP respectivamente e apresentam melhor relação custo/benefício devido à maior diluição em testes IIQ para carcinomas mamários.

## **ANEXO**

### **PROTOCOLO PARA ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO**

Padronização adotada pelo Laboratório de Imunohistoquímica Aplicada à Patologia Mamária da Faculdade de Medicina/UFMG a partir de 20/04/2001.

#### **DESPARAFINIZAÇÃO**

1. Manter as lâminas em Estufa a 36°C – tempo suficiente para secarem;
2. Imediatamente após retirar da Estufa imergir as lâminas em Xilol – 20’;
- 3.

#### **BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA**

3. Imergir as lâminas em Álcool Absoluto: 10 “mergulhos” em cada uma das 3 cubas;
4. Imergir as lâminas em solução de Peróxido de Hidrogênio 3%, preparada momentos antes do uso:

Peróxido de Hidrogênio 30% P.A. – 10 ml  
Álcool Metílico P.A. – 90 ml

Deixar por 20’;

5. Pré-aquecer o Steamer: encher, até a marca permitida, o reservatório de água do aparelho com Água Destilada; montá-lo, ligá-lo na tomada e girar o botão do timer do aparelho até o final;
6. Imergir as lâminas em Álcool Absoluto: 10 “mergulhos” em cada uma das 3 cubas;
7. Imergir as lâminas em Tampão PBS pH 7,2 – 7,4;

#### **REATIVAÇÃO ANTIGÊNICA**

8. Pré-aquecer o Tampão Citrato pH 6,0 no Microondas potência alta – 40” para cuba pequena (40 ml), 90” para cuba maior (200 ml);
9. Transferir as lâminas para a cuba com Tampão Citrato pH 6,0 pré-aquecido.

Observar a saturação de vapor no Steamer, a partir deste momento transferir a cuba com as lâminas para o aparelho – 25' ;

10. Resfriamento: retirar a cuba com as lâminas do Steamer e manter em temperatura ambiente – 30' ;

11. Imergir as lâminas em Tampão PBS pH 7,2 – 7,4 – 5' ;

## **ANTICORPOS**

12. Tomar as lâminas, uma a uma, secar ao redor dos cortes e pingar uma gota de Soro Normal de Cabra (do kit de reação) sobre cada corte, incubar em Câmara Úmida - 30' ;

Usar o soro em temperatura ambiente.

13. Escorrer o Soro Normal e gotejar 50 microlitros do Anticorpo Primário designado para cada um dos cortes: consultar o caderno de Registros de Reação; incubar em câmara úmida – 90'

\* Usar o Anticorpo em temperatura ambiente.

14. Lavar cada uma das lâminas com Tampão PBS utilizando a garrafa de banhos e imergi-las em 2 banhos também de Tampão PBS – 5' cada;

15. Tomar as lâminas, uma a uma, secar ao redor dos cortes e pingar uma gota do anticorpo secundário (link) sobre cada corte; incubar em Câmara Úmida – 30' ;

\* Usar o Anticorpo em temperatura ambiente.

16. Lavar cada uma das lâminas com Tampão PBS utilizando a garrafa de banhos e imergi-las em 2 banhos também de Tampão PBS – 5' cada;

17. Tomar as lâminas, uma a uma, secar ao redor dos cortes e pingar uma gota do complexo estreptoavidina biotina peroxidase sobre cada corte; incubar em Câmara Úmida – 30' ;

\* Usar o complexo em temperatura ambiente.

18. Lavar cada uma das lâminas com Tampão PBS utilizando a garrafa de banhos e imergi-las em 2 banhos também de Tampão PBS – 5' cada;

## **REVELAÇÃO DA REAÇÃO**

19. Preparar a solução de DAB (Liquid DAB, Dako, EUA) segundo as instruções do fabricante;

20. Tomar as lâminas, uma a uma, secar ao redor dos cortes e gotejar 50 microlitros da solução de DAB – 10'

21. Parar a reação mergulhando as lâminas em água destilada;
22. Lavar as lâminas em Água Corrente – 5’;
23. Contracorar os cortes com Hematoxilina de Harris – 2”
24. Lavar as lâminas em Água Corrente – 5’;

#### **DESIDRATAÇÃO E MONTAGEM**

25. Imergir as lâminas em Álcool Absoluto: 10 “mergulhos” em cada uma das 4 cubas;
26. Imergir as lâminas em Xilol: 10 “mergulhos” em cada uma das 2 cubas;
27. Manter as lâminas na 2ª cuba de Xilol enquanto realizar a montagem com lamínulas e Entellan.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allred, D. C., J. M. Harvey, *et al.* Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol, v.11, n.2, Feb, p.155-68. 1998.

Camp, R. L., L. A. Charette, *et al.* Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. Lab Invest, v.80, n.12, Dec, p.1943-9. 2000.

Fitzgibbons, P. L., D. L. Page, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med, v.124, n.7, Jul, p.966-78. 2000.

Gobbi, H., C. L. Arteaga, *et al.* Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. Histopathology, v.36, n.2, Feb, p.168-77. 2000.

Gobbi, H., W. D. Dupont, *et al.* Breast cancer risk associated with estrogen receptor expression in epithelial hyperplasia lacking atypia and adjacent lobular units. Int J Cancer, v.113, n.5, Feb 20, p.857-9. 2005.

Gouvêa, A., J. Fernandes, *et al.* Her-2/ neu immunoreactivity in invasive mammary carcinomas: a comparative study using monoclonal and polyclonal antibodies including the Herceptest. J B Patol, v.40, n.1, p.47-52. 2004.

Hammond, M. E., P. Barker, *et al.* Standard reference material for Her2 testing: report of a National Institute of Standards and Technology-sponsored Consensus Workshop. Appl Immunohistochem Mol Morphol, v.11, n.2, Jun, p.103-6. 2003.

Harvey, J. M., G. M. Clark, *et al.* Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. J Clin Oncol, v.17, n.5, May, p.1474-81. 1999.

Hoos, A. e C. Cordon-Cardo. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. Lab Invest, v.81, n.10, Oct, p.1331-8. 2001.

Jacobs, T. W., J. E. Prioleau, *et al.* Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. J Natl Cancer Inst, v.88, n.15, Aug 7, p.1054-9. 1996.

Kononen, J., L. Bubendorf, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med, v. 4, p. 844-7. 1998.

Moch, H., P. Schraml, *et al.* High-throughput tissue microarray analysis to evaluate

genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. Am J Pathol, v.154, p. 981-6. 1999.

Moch, H., J. kononen, *et al.* Tissue Microarrays: What Will They Bring to Molecular and Anatomic Pathology? Am J Pathol, v. 8, n. 1, Jan, p. 14-20. 2001.

Page, D. L., R. A. Jensen, *et al.* Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. Breast Cancer Res Treat, v.51, n.3, p.195-208. 1998.

Rhodes, A., B. Jasani, *et al.* Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors: a comparative study involving results from laboratories in 21 countries. Am J Clin Pathol, v.118, n.3, Sep, p.408-17. 2002.

Study of interlaboratory reliability and reproducibility of estrogen and progesterone receptor assays in Europe. Documentation of poor reliability and identification of insufficient microwave antigen retrieval time as a major contributory element of unreliable assays. Am J Clin Pathol, v.115, n.1, Jan, p.44-58. 2001.

Immunohistochemical demonstration of oestrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on in house tumours with that achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries. J Clin Pathol, v.53, n.4, Apr, p.292-301. 2000.

Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. J Clin Pathol, v.53, n.2, Feb, p.125-30. 2000.

Schmitt, F. C. Marcadores prognósticos em carcinoma mamário. Manual de imuno-histoquímica. Sociedade Brasileira de Patologia. São Paulo, p. 30-46. 1999

Schmitt, F. C., M. J. Bento, *et al.* Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. Diagn Cytopathol, v.13, n.4, Nov, p.347-51. 1995.

Schmitt, F. C., E. M. Pereira, *et al.* The proliferating cell nuclear antigen index in breast carcinomas does not correlate with mitotic index and estrogen receptor immunoreactivity. Pathol Res Pract, v.190, n.8, Sep, p.786-91. 1994.

Tavassoli, F. A. e D. P, Eds. World Health Organization Classification of Tumours Tumours of the Breast and Female Genital Organised. 2003.