

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Emily Ferreira Salles Pilar

**Padronização dos protocolos de
marcadores imuno-histoquímicos para
uso em plataforma de automação.**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2015**

Emily Ferreira Salles Pilar

Padronização dos protocolos de marcadores imuno-histoquímicos para uso em plataforma de automação.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor

Orientador: Dr. Claudio Galleano Zettler

**Porto Alegre
2015**

Emily Ferreira Salles Pilar

Título: Padronização dos protocolos de marcadores imuno-histoquímicos para uso em plataforma de automação.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Aprovada em: 29/04/2015

Banca Examinadora

Dr. Vinicius Duval da Silva
PUC/RS

Dra. Marcia Silveira Graudenz
UFRGS

Dra. Adriana Vial Roehe
UFCSPA

Dra. Marilda da Cruz Fernandes
UFCSPA

Porto Alegre

2015

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir concluir mais uma etapa importante em minha vida e renovar minhas forças todas as manhãs.

Aos meus pais, Vera Lucia Ferreira Salles e Paulo Pires Salles com quem aprendi que as coisas feitas com responsabilidade e com o coração são as mais gratificantes. Obrigada pelo amor, pelo apoio, pela compreensão e por acreditarem em mim.

Ao meu esposo, Leandro Pilar que me acompanha desde a graduação, sempre me apoiando, incentivando e acreditando na minha capacidade. Obrigada por superar minha ausência e me auxiliar em tudo o que precisei para que este trabalho fosse concluído, cuidando do nosso lar e torcendo pela minha realização.

A minha amiga, designer gráfica e irmã, Evelyn Ferreira Salles pelo carinho e atenção com tudo o que se relaciona a minha vida acadêmica e profissional, em especial pelo empenho e disponibilidade na concretização do manual ilustrado de padronização, sem ti não teria sido possível. Obrigada por não desistir da idéia.

As minhas amigas Elenise Machado, Fabiane Andrade, Celi Bitencourt, Eliane Moura, Karina Minozzo, Liane Marisco, Gabriela Remonato, Elhane Gomes e Cintia Escobar, pela torcida pelo carinho nas horas difíceis e por acreditarem em minha capacidade de realizar este trabalho. Obrigada pela paciência e cooperação.

Ao meu orientador Dr. Claudio Zettler, pela orientação construtiva neste trabalho e por aceitar me conduzir até este momento acreditando em minhas virtudes e relevando minhas deficiências.

A Dra. Marinez Bizarro Barra, com quem aprendi a ter consciência de fazer sempre o melhor pelo paciente. Agradeço pela acolhida, por me mostrar onde encontrar o conhecimento e compartilhar comigo toda informação necessária para que eu me tornasse uma profissional melhor. Minha eterna gratidão e admiração.

Ao Dr. Rafael Brighenti entusiasta do meu projeto que me auxiliou com tanta presteza, admirando-se com a beleza das lâminas que fotografamos e me inspirando a seguir, meu eterno agradecimento.

Aos técnicos Elenise Machado e João Marcos Rodrigues, do Laboratório de Patologia da Santa Casa de Porto Alegre que me auxiliaram nessa jornada e à minha chefia que nunca hesitou em me dispensar para atividades do doutorado.

A Dra. Jane Ulbrich, minha chefia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por compreender e incentivar minhas atividades do doutorado.

Ao Dr. Diego Uchoa, pelo interesse em minha tese e comentários construtivos.

A todos os colegas do Laboratório de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial aos colegas Elhane Gomes, Mara Brandão, Noeli Tavares, Gabriela Remonato, Rodrigo Ferres e Wandercléia Oliveira, pelo apoio em momentos decisivos da elaboração deste trabalho.

Aos assessores científicos Ricardo Russo, Fabiana Aliperti, Igor Luchianciuc e Suzan Paes que me esclareceram muitas dúvidas sobre imunohistoquímica ao longo desses anos.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Imuno-histoquímica	1
1.2	Aplicações do exame imuno-histoquímico em patologia	2
1.3	Fatores que influenciam o teste Imuno-histoquímico	17
1.3.1	Fase pré-analítica	18
1.3.2	Fase analítica	22
1.3.3	Fase pós-analítica	40
1.4	Controle de qualidade em Imuno-histoquímica	41
1.5	Protocolo da Imuno-histoquímica	45
1.6	Automação em Imuno-histoquímica	47
1.6.1	Plataforma Benchmark XT-Ventana	49
2	Objetivos	58
3	Justificativa	59
4	Artigo científico	60
5	Resultados	72
6	Considerações finais	81
7	Bibliografia	87
	Anexo I - Tabela 6. Anticorpos para padronização	98
	Anexo II - Tabela 7. Protocolos para Automação Benchmark XT	102
	Anexo III - Metodologia	105
	Anexo IV - Tabela 8. Tecidos para padronização dos protocolos	108
	Anexo V - Agrupamento de anticorpos por utilidade	111
	Anexo VI - Manual de padronização	112
	Anexo VII - Parecer do Comitê de ética	172

Lista de Abreviaturas

ABC - Complexo avidina/biotina
ACTH - Adrenocorticotropina
AEC - 3-amino-9-etilcarbazol
ASCO - *American Society of Clinical Oncology*
CAP - *College of American Pathologists*
CC1 - *Cell conditioning 1*
CC2 - *Cell conditioning 2*
CEA - Antígeno carcinoembrionário
CEP - Comitê de ética em pesquisa
CkAPM - Citoqueratina alto peso molecular
CMV - Citomegalovírus
DAB - 3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorato
DNA – Ácido desoxirribonucleíco
EBV - *Epstein Barr virus*
EDTA - Ácido etilenediaminotetracético
EMA - Antígeno epitelial de membrana
EPOS- *Polymer one-step staining*
FISH – Hibridização in situ por fluorescência
FSH - Hormônio folículo-estimulante
GIST - Tumores estromais gastrintestinais
HCG - Gonadotropina coriônica
HE - Hematoxilina-eosina
HRP - *Horseradish peroxidase*
IHQ - Imuno-histoquímica
KLC – Cadeia leve Kappa
LCS - *Liquid Coverslip*
LCA- Antígeno comum leucocitário
LH - Hormônio luteinizante
LLC- Cadeia leve Lambda
LSAB - streptavidina marcada com biotina
MOC31 - Antígeno relacionado ao epitélio
NK – *Natural killer*
NORDICQC- *Nordic quality Control*
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAP - Peroxidase-anti-peroxidase

PAS - Ácido periódico de Schiff

PLAP - Fosfatase alcalina placentária

POP - Procedimento operacional padrão

PSMA - Antígeno da membrana específica da próstata

RE- Receptor de estrógeno

RP - Receptor de progesterona

SSC - *Sodium Chloride Sodium Citrate buffer*

TMA-*Tissue microarray*

TSH - Hormônio tireoestimulante

TTF1 - Fator de transcrição da tireóide

UKNEQUAS -*United Kingdom National Quality Assessment Service*

Resumo

Introdução: A demanda pelo exame imuno-histoquímico na rotina diagnóstica nos laboratórios de Anatomia Patológica cresce exponencialmente. A introdução de biofármacos dirigidos a moléculas-alvo exige resultados precisos, neste contexto, há uma tendência nos laboratórios de introduzir a automação em imuno-histoquímica. O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Anatomia Patológica do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre no ano de 2012. **Objetivo:** realizar a padronização de 120 anticorpos primários concentrados provenientes de diversos fabricantes na Plataforma de automação Benchmark XT (Ventana *Medical Systems/Roche Tissue Diagnostics*, Tucson AZ, EUA). **Critério de inclusão:** foram selecionados para a padronização os 120 anticorpos concentrados utilizados com maior frequência no laboratório. Para os testes foram selecionadas 41 amostras de tecido contendo o antígeno de interesse, provenientes de peças cirúrgicas, fixadas em formalina 10% tamponada e positivas em reação Imuno-histoquímica manual. **Resultados:** Foram padronizados 120 marcadores. O protocolo mais frequente foi uso de recuperação antigênica com *Cell Conditioning 1* por 60 minutos e incubação no anticorpo primário por 32 minutos a 42°C. A diluição mais frequente foi 1:100. **Conclusão:** A automação atende às exigências de padronização concomitante ao aumento da demanda. Esperamos que o manual desenvolvido seja referência para trabalhos futuros e aos laboratórios com interesse em automatizar sua rotina imuno-histoquímica.

Palavras-chave: anticorpos, automação, imuno-histoquímica, padronização.

Catálogo na Publicação

Pilar, Emily Ferreira Salles
Padronização dos protocolos de marcadores
imuno-histoquímicos para uso em plataforma de automação.
/ Emily Ferreira Salles Pilar. -- 2015.
173 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em
Patologia, 2015.

Orientador(a): Cláudio Galleano Zettler.

1. Imuno-histoquímica. 2. Automação. 3. Anticorpos. 4.
Padronização. 5. Anatomia patológica. I. Título.

1 Introdução

1.1 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é uma técnica que compreende um conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos como reagentes específicos para detecção de proteínas presentes em amostras de tecido (Fig. 1). A técnica é utilizada nos laboratórios de patologia e amplia a capacidade diagnóstica, representando uma importante ferramenta na identificação de uma variedade de proteínas (Brasileiro Filho, 1994; Moreau *et al.*, 1998).

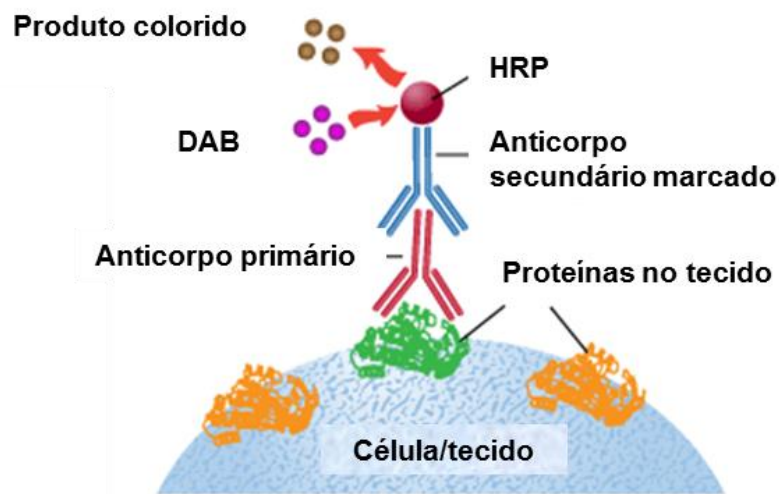


Fig 1. Imuno-histoquímica-indireta.

Modificado de: <http://www.leinco.com/immunohistochemistry>

No laboratório de anatomia patológica o estudo convencional das amostras é feito pela coloração de Hematoxilina-Eosina, porém esta análise pode ser insuficiente para permitir uma conclusão diagnóstica. Neste cenário uma técnica específica como a imuno-histoquímica (IHQ) possui inestimável valor para o entendimento da etiologia e patogênese de muitos processos patológicos, impactando nas decisões terapêuticas (Brasileiro Filho, 1994; Jackson e Blythe, 2008).

1.2 Aplicações do exame imuno-histoquímico em Patologia

❖ Diagnóstico de neoplasias morfológicamente indiferenciadas

De acordo com o critério histomorfológico a neoplasia é denominada pelo tecido ou célula que está proliferando. A nomenclatura dos tumores, neste critério, usualmente é constituída do nome da célula, do tecido ou órgão e se acrescentam os sufixos (- oma) ou (- sarcoma) (Brasileiro Filho, 1994).

A imuno-histoquímica auxilia na identificação de uma assinatura bioquímica das células neoplásicas pobremente diferenciadas (anaplásicas), cuja aparência isoladamente na microscopia não se assemelha a nenhum tecido normal maduro (Jackson e Blythe, 2008). A assinatura bioquímica inclui a expressão de alguns tipos de antígenos como epitelial (Fig.2), hematolinfóide (Fig.3) ou melanocítico (Fig.4) ou uma expressão de combinação única.

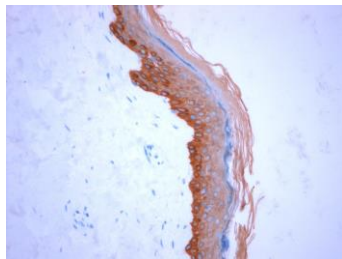


Fig. 2 Ck AE1/AE3 em pele

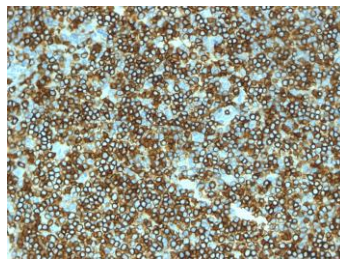


Fig.3 LCA em linfonodo

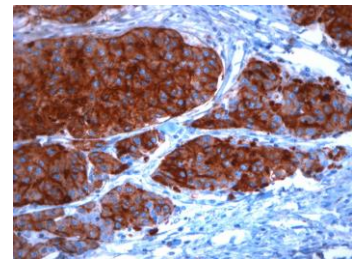


Fig.4 Melanosome em pele

Fonte: Elaborado pelo autor

❖ Subtipagem de neoplasias

As recomendações de classificação estabelecidas pela OMS (Organização Mundial da Saúde) no documento *The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research* para as neoplasias linfóides representam um consenso internacional no intuito de padronizar critérios

necessários ao estabelecimento de um diagnóstico preciso e reprodutível (Jaffe, 2009; Soldini e Campo, 2012).

As diferenças na morfologia das células constituintes das doenças hematolinfóides são sutis, as doenças podem derivar dos mesmos tipos celulares em estágios distintos de maturação. Para um diagnóstico correto, as neoplasias linfóides devem ser estudadas a partir da análise de parâmetros morfológicos, imunofenotípicos e citogenéticos, além da avaliação das características clínicas e moleculares (Lu e Chang, 2011; Soldini e Campo, 2012).

Os linfomas não-Hodgkin podem ser subdivididos em dois grandes grupos linfoma de células B e linfoma de células T/NK, a determinação da linhagem celular deve ser por análise imunofenotípica das células tumorais (Malactosy, 2005).

A molécula de membrana CD20 (Fig. 5) é um valioso marcador da linhagem de células B, útil no diagnóstico de linfomas de células B por estar praticamente ausente em linfomas de células T. O anticorpo CD79a é altamente específico para células B normais e neoplásicas além dos anticorpos Pax-5 e BOB1 (Alves *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 2006).

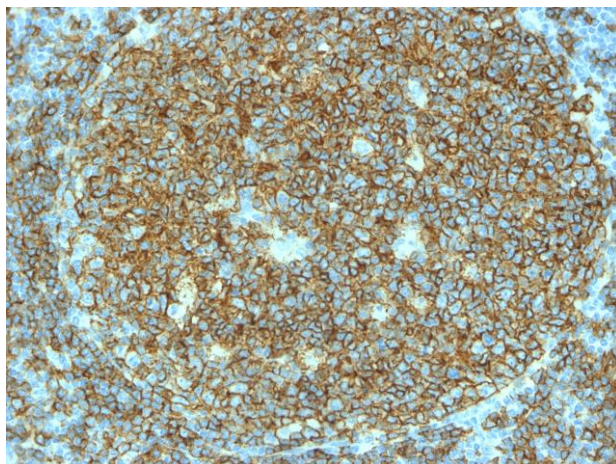


Fig.5 Marcação Imuno-histoquímica para CD20 em linfonodo

Fonte: Elaborado pelo autor

Um painel para o diagnóstico de um linfoma T deve incluir o anticorpo CD3 (Fig. 6), que é um marcador sensível e específico para demonstração de diferenciação T e está expresso pela maior parte das células T neoplásicas.

O antígeno CD5 está presente na superfície de 95% das células T periféricas, marcador de células maduras é muito útil para classificar neoplasias mais diferenciadas, porém está expresso também em neoplasias linfóides de célula B (Alves *et al.*, 1999; Lu e Shang, 2011).

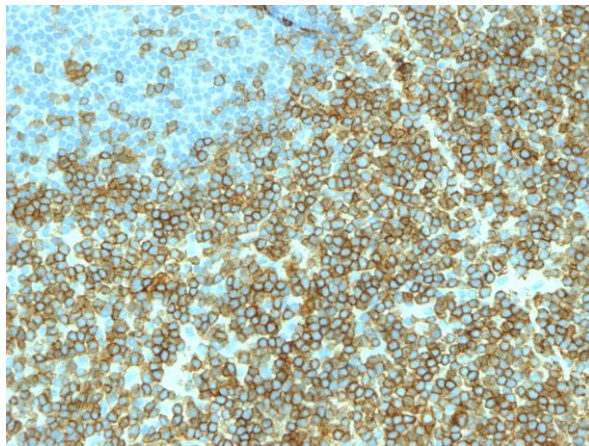


Fig. 6 Marcação imuno-histoquímica para CD3

Fonte: Elaborado pelo autor

O antígeno CD4 está presente em células T auxiliares, o antígeno CD8 está presente em células T citotóxicas. A relação de células CD4/CD8 pode determinar se um infiltrado de células T é reacional ou neoplásico (Alves *et al.*, 1999).

Como auxiliar no diagnóstico de neoplasias dendríticas e histiocíticas os marcadores que podem ser utilizados são: CD21, CD35, CD163, Langerina e PS100 (Lu e Shang, 2011).

A localização dos antígenos CD incluídos neste estudo pode ser consultada na tabela abaixo.

Tabela 1. Expressão de antígenos CD

Antígenos CD	Expressão celular
CD 1a	Timócitos corticais, células de Langerhans, células dendríticas
CD 3	Timócitos e células T
CD 4	Subgrupos de timócitos, células T, monócitos e macrófagos
CD 5	Timócitos, células T, subgrupo de células B
CD 7	Células hematopoiéticas pluripotentes, timócitos, células T
CD 8	Subgrupos de timócitos, células T citotóxicas
CD 10	Precursores de células T e B, células do estroma da medula óssea
CD 15	Neutrófilos, eosinófilos, monócitos
CD 19	Células B
CD 20	Células B
CD 21	Células B maduras, células dendríticas foliculares
CD 23	Células B maduras, macrófagos ativados, eosinófilos, células dendríticas foliculares, plaquetas
CD 30	Células T, B e NK ativadas, monócitos
CD 31	Monócitos, plaquetas, granulócitos, subpopulação de células T, células endoteliais
CD 34	Precursores hematopoiéticos, endotélio capilar
CD 38	Células T e B precoces, células T ativadas, células B do centro germinativo, plasmócitos
CD 43	Leucócitos, exceto células B em repouso
CD 45	Todas as células hematopoiéticas
CD 57	Células NK, subgrupos de células T, células B e monócitos
CD 68	Monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, grandes linfócitos
CD 79a	Células B
CD 99	Linfócitos sanguíneos periféricos e timócitos
CD 117	Progenitores hematopoiéticos
CD 138	Células B

Fonte: Janeway, 2007.

❖ Pesquisa de sítio primário de carcinoma metastático

Em um contexto apropriado, um marcador imuno-histoquímico pode permitir a identificação precisa do sítio primário de uma neoplasia. Entretanto, a maioria das neoplasias requer o uso de um painel de anticorpos para identificação do provável local de origem de metástases tumorais, especialmente, em tumores indiferenciados (Jackson, 2008; Anderson e Weiss, 2010).

A determinação do tipo celular que originou a metástase na prática clínica atual utiliza a combinação de resultados imuno-histoquímicos e informações clínicas, como local da biópsia, sexo, idade e história clínica (Anderson e Weiss, 2010; Krishna, 2010).

Conforme a meta-análise de Anderson e Weiss 2010, a IHQ permitiu a identificação correta do tecido em 82,3% dos casos compostos de amostras de tumor primário e metastático e em 65,6% no grupo de tumores metastáticos (Anderson e Weiss, 2010).

O aumento da precisão na identificação do sítio primário de tumores metastáticos, pode ser alcançado pelo desenvolvimento de novos marcadores tecido-específicos e com o uso de algoritmos mais efetivos para aplicação nos resultados imuno-histoquímicos (Anderson e Weiss, 2010).

Algumas neoplasias podem ser identificadas pela presença de marcadores específicos, como o antígeno específico prostático (PSA) da próstata, tireoglobulina da tireóide e o GCDFP-15 da mama (Jackson e Blythe, 2008).

Em carcinomas um importante indicador prognóstico é a presença ou ausência de metástase em um linfonodo sentinela, que é o primeiro a receber a drenagem linfática do tumor primário. A detecção de células tumorais isoladas (de 0,2 mm a 2 mm em sua maior dimensão) ou de micrometástases (pequenos grupamentos celulares medindo menos de 0,2 mm em sua maior dimensão) em linfonodos sentinela, aplicada em carcinoma de mama e melanoma, tem sua sensibilidade aumentada quando se utiliza a IHQ (Carcoforo *et al.* 2002; Sobin e Wittekind, 2002; Jackson, 2008).

A biópsia do linfonodo sentinela é uma técnica acurada para identificação de metástases pela associação do uso de hematoxilina-eosina e IHQ para avaliação de todo o linfonodo (Carcoforo *et al.*, 2002; Jackson e Blythe, 2008; Piatol, *et al.*, 2008).

Em carcinoma de mama a avaliação da presença ou ausência de metástase em linfonodo axilar é um importante fator prognóstico, contribuindo para as decisões

quanto ao tratamento com quimioterapia adjuvante e conduta cirúrgica (Gobardhan *et al.*, 2009; Abreu *et al.*, 2014).

❖ **Caracterização de produtos de secreção de células neoplásicas**

O sistema de células neuroendócrinas pode ser dividido em células originando glândulas como a adenohipófise, ou células do sistema neuroendócrino difuso presentes em tecidos como pele, tireóide, pulmão, pâncreas, trato gastrointestinal (Kloppel, 2007).

As células do sistema neuroendócrino difuso estão dispersas entre outras células dificultando seu reconhecimento pela coloração de HE. A IHQ auxilia na caracterização de células neuroendócrinas e seus tumores (Alves *et al.*, 1999; Kloppel, 2007).

Grande parte das neoplasias neuroendócrinas epiteliais bem diferenciadas expressa algum marcador neuroendócrino como cromogranina, enolase neuro-específica, sinaptofisina, PS100 ou molécula de adesão de células neurais. O uso destes marcadores pode ser útil na análise de doença metastática (Alves *et al.*, 1999; Klimstra *et al.*, 2010).

Cromograninas são proteínas solúveis presentes em grânulos secretórios de células endócrinas e neurais, sendo um excelente marcador deste tipo celular (Alves *et al.*, 1999; Kloppel, 2007).

O uso do anticorpo Enolase neuro-específica como marcador neuroendócrino deve ser feito com cautela, pois exhibe também uma marcação não-específica em tumores e tecidos saudáveis não endócrinos como o tecido muscular (Alves *et al.*, 1999; Kloppel, 2007).

Sinaptofisinas estão contidas nas vesículas pré-sinápticas de neurônios e em pequenas vesículas de células endócrinas normais e neoplásicas. Apresentam imunorreatividade no sistema nervoso central e periférico sendo, portanto marcador de diferenciação neuroendócrina (Alves *et al.*, 1999; Kloppel, 2007).

A proteína S100 está presente em células gliais, neurônios, células reticulares dendríticas, melanócitos, macrófagos e células de Schwann, podendo ser útil na demonstração de origem ectodérmica dos tumores (Alves *et al.*, 1999; Ghilusi *et al.*, 2009).

Frequentemente encontrada no sistema nervoso periférico, S100 é um marcador fundamental no diagnóstico de Schwannoma, tumor benigno derivado das células de Schwann, que exibem uma imunomarcção nuclear e citoplasmática intensa (Ghilusi *et al.*, 2009).

A molécula de adesão de células neurais (N-CAM, CD56), comprometida com a função de adesão celular, pode ser encontrada em células do sistema nervoso e células neuroendócrinas. No entanto, pode estar expressa em tecidos sadios e neoplásicos não endócrinos (Alves, *et al.*, 1999; Kloppel, 2007).

A calcitonina está presente no carcinoma medular da tireóide. Insulina e glucagon são polipeptídeos pancreáticos. Tumores epiteliais neuroendócrinos podem iniciar na maioria dos tecidos epiteliais, mas são mais frequentes no trato gastrointestinal, pâncreas e pulmão (Kloppel, 2007; Klimstra *et al.*, 2010).

Alguns tumores não neuroendócrinos como sarcomas, carcinomas hepatocelulares, timomas, carcinomas renais e carcinoma espinocelular no pulmão podem produzir hormônios. A presença de células endócrinas em tumores não endócrinos ocorre em muitos órgãos (Alves *et al.*, 1999).

As células adeno-hipofisárias são classificadas de acordo com sua produção hormonal em 5 tipos: somatotróficas (GH), lactotróficas (Prolactina), corticotróficas (ACTH), gonadotróficas (FSH e LH) e tireotróficas (TSH) (Alves *et al.*, 1999).

Adenomas hipofisários são tumores benignos originados e constituídos por células da adeno-hipófise, podem secretar hormônios em excesso ou em menor quantidade alterando a homeostase endócrina (Kovacs, *et al.*, 2001).

Clinicamente podem ser causa de acromegalia (adenoma somatotrófico produtor de GH), gigantismo, Síndrome de Cushing (adenoma corticotrófico produtor de ACTH), aminorréia-galactorréia e hipertireoidismo (Kovacs, *et al.*, 2001).

Para a classificação de adenomas hipofisários (Tab. 2), além da similaridade com as células do parênquima normal é crucial demonstração por IHQ da expressão específica de hormônios hipofisários (Alves *et al.*, 1999; Saeger *et al.*, 2007; Klimstra *et al.*, 2010).

Tabela 2. Classificação dos Adenomas Hipofisários (Alves *et al.*, 1999; Kovacs *et al.*, 2001; Saeger *et al.*, 2007; Zada *et al.*, 2011)

Adenomas Hipofisários	Perfil de Produção hormonal	Reatividade IHC
Adenoma Somatotrófico	Produtor de Hormônio do crescimento	GH
Adenoma Lactotrófico	Produtor de Prolactina	PRL
Adenoma Corticotrófico	Produtor de hormônio corticotrófico	ACTH
Adenoma Corticotrófico silencioso	Produtor de hormônio corticotrófico sem hipercortisolismo clínico	ACTH
Adenoma Gonadotrófico	Produtor de Hormônio Folículo Estimulante e/ou Luteinizante	FSH e/ou LH
Adenoma Tireotrófico	Produtor de Hormônio Tireo-estimulante	TSH
Adenoma Bi-hormonal	Produtor de Hormônio do crescimento e Prolactina	GH e PRL
Adenoma de Células "Null"	Sem expressão de marcadores e sintomas de excesso de hormônio	Ausente
Adenoma Pluri-hormonal monomórfico	Uma população celular produzindo dois ou mais tipos de hormônio	GH, PRL, TSH e FSH, LH
Adenoma Pluri-hormonal plurimórfico	Dois ou mais tipos celulares produzindo um hormônio	GH, PRL, TSH e FSH, LH
Adenoma Atípico	Alto índice mitótico (Ki67 \geq 3%) e extensa imunorreatividade de P53	Ki67, P53, GH, PRL

ACTH: hormônio corticotrófico, FSH: hormônio folículo-estimulante, GH: hormônio do crescimento, LH: hormônio luteinizante, PRL: prolactina, TSH: hormônio tireo-estimulante

❖ Definição de malignidade

As proliferações reativas podem resultar em tumores que mimetizam neoplasias, representando um desafio, diferenciar na microscopia, os processos reacionais das neoplasias. No desenvolvimento de linfomas, por exemplo, a amostra pode exibir uma alteração na proporção de linfócitos B e T, uma avaliação por imuno-histoquímica pode ser útil neste caso (Jackson e Blythe, 2008).

Proliferações linfóides neoplásicas, em particular linfomas não-Hodgkin, são clonais, compostas exclusivamente de linfócitos B ou T, enquanto que em proliferações tipicamente reativas coexistem os dois tipos celulares (Jackson e Blythe, 2008).

❖ Avaliação prognóstica de neoplasias

O método imuno-histoquímico é utilizado para detectar marcadores prognósticos que indicam o comportamento biológico do tumor. Na abordagem terapêutica do carcinoma mamário, doença de alta heterogeneidade clínica e morfológica testar receptores hormonais de estrógeno (RE), progesterona (RP) e HER2 tornou-se essencial (Alves *et al.*, 1999; Cianfrocca e Gradishar, 2009; Feldstein, 2010; Cirqueira, *et al.*, 2011; Viale, 2012).

A avaliação do carcinoma de mama deve incluir parâmetros imuno-histoquímicos como a análise dos receptores de estrógeno e progesterona, HER2 e Ki67, estes marcadores são considerados fatores prognósticos e preditivos (Cianfrocca e Goldstein, 2004; Viale, 2012).

Com o uso da técnica IHQ é possível identificar quatro subtipos de câncer de mama: triplo negativo (RE, RP e HER2-negativo), HER2 (RE, RP-negativos, HER2-

positivo), Luminal A (RE-positivo e/ou RP-positivo e HER2-negativo ou baixo índice proliferativo avaliado por Ki67) e Luminal B (RE-positivo e/ou RP-positivo e HER2-positivo e/ou alto índice proliferativo avaliado por Ki67). No entanto, a classificação por IHQ não se sobrepõe completamente a classificação molecular (Perou *et al.*, 2000; Hugh *et al.*, 2009; Viale, 2012).

Os receptores hormonais (RE/RP) são proteínas nucleares responsáveis pela mediação dos efeitos do estrógeno e da progesterona no epitélio mamário e apresentam correlação com curso clínico dos carcinomas de mama (Alves *et al.*, 1999).

Outro parâmetro prognóstico de grande impacto é a avaliação da fração proliferativa do carcinoma de mama, feita através do resultado da marcação do anticorpo Ki67 na amostra (Alves *et al.*, 1999 e Viale, 2012).

O câncer de mama HER-2 positivo representa um subtipo com diferenças moleculares, de epidemiologia clara e pior prognóstico. O *HER2*, pode estar amplificado em 20% -25% dos cânceres de mama (Recondo *et al.*, 2014).

❖ **Identificação de agentes infecciosos**

A identificação de agentes infecciosos na microbiologia é a maneira tradicional de estabelecer a etiologia da doença infecciosa, no entanto, o estudo histopatológico pode apresentar um papel importante na determinação ou exclusão no diagnóstico. Alguns patógenos virais importantes detectados por IHQ são o citomegalovírus (CMV), o Epstein-Barr vírus (EBV), o herpes vírus tipo I e II, o adenovírus e o poliomavírus (Elias, 1995; Barra, 2006; Gupta *et al.* 2009).

Alguns microorganismos são claramente visíveis na coloração de HE, mas frequentemente colorações histoquímicas são necessárias para a sua completa caracterização. A sensibilidade das colorações histoquímicas é influenciada pela escolha da coloração, quantidade de microorganismos, habilidade do patologista em reconhecer o microorganismo e qualidade da coloração, entretanto as colorações histoquímicas permanecem sendo o método mais utilizado no diagnóstico histopatológico de doenças infecciosas (Procop e Wilson, 2001).

Para o diagnóstico de uma infecção fúngica a coloração de Gomori (Grocott) pela metenamina de prata é um método sensível e de fácil interpretação. Entretanto, em pacientes imunossuprimidos, a morfologia aberrante pode dificultar a interpretação sendo útil um método específico para o fungo como a IHQ (Elias 1995; Alves *et al.*, 1999).

Especialmente em pacientes imunocomprometidos, o diagnóstico de processos infecciosos por reações sorológicas, é falho em consequência da disfunção do sistema imune, nestes pacientes o uso da IHQ pode contribuir (Alves *et al.*, 1999).

A informação histopatológica pode ser utilizada para corroborar os resultados microbiológicos, através da utilização de técnicas histoquímicas, imuno-histoquímicas ou de Hibridização *In Situ*, métodos especialmente úteis quando a cultura não é possível ou quando o agente infeccioso possui crescimento lento (Procop e Wilson, 2001).

Poliomavíroses humanas estabelecem infecções subclínicas persistentes quase que exclusivamente em indivíduos imunossuprimidos. O vírus em latência possui uma capacidade de reativação. Os vírus da família Poliomavírus JC Virus

(JCV), BK vírus (BKV), apresentam semelhanças na organização do genoma e sequências de DNA com o Simian vírus 40 (SV40). (Kwak *et al.*, 2002; Ahsna e Shah, 2006; Waleed *et al.*, 2007).

Mais de 70% da população em todo o mundo possui evidência sorológica de exposição ao BK vírus (BKV), o mais prevalente em humanos e seu sítio preferencial é o parênquima renal. A infecção primária ocorre tipicamente na infância sem sintomas específicos e o vírus permanece em estado não replicativo no epitélio renal e células uroteliais (Hirsch, 2005; Waleed *et al.*, 2007).

O paciente transplantado renal fica vulnerável aos danos da reativação viral durante a imunossupressão profilática ou terapêutica contra a rejeição. A nefropatia por BKV atualmente é a doença viral que mais afeta o rim transplantado, sendo causa conhecida de fracasso do transplante renal. O diagnóstico depende da biópsia exibindo o efeito citopático viral, além da confirmação por IHQ (Ahsan, 2006; Beimler *et al.*, 2007; Montagner *et al.*, 2007; Badwal *et al.*, 2011).

A população de risco para o desenvolvimento de Poliomavíroses está altamente suscetível a um quadro clínico irreversível com alta taxa de morbidade, o que requer uma estratégia diagnóstica sensível para uma identificação célere desta infecção (Montagner *et al.* 2007).

A biópsia do enxerto e a IHQ são obrigatórias para a análise histológica quando o BKV está presente (Fig. 7). As mesmas técnicas eleitas para o diagnóstico podem ser usadas para monitoramento da resolução da doença (Tong, *et al.*, 2004; Montagner *et al.*, 2007).

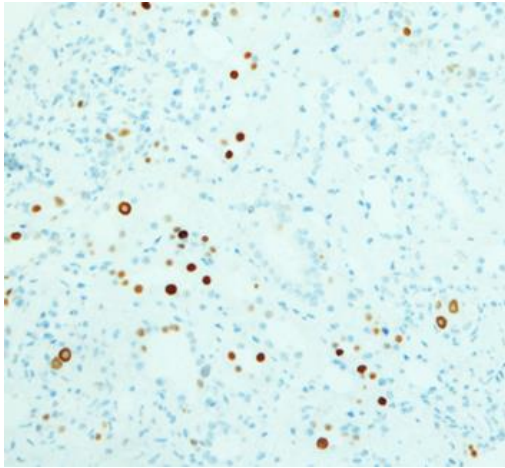


Fig.7 Imuno-histoquímica para Poliomavírus no parênquima renal

Fonte: Elaborado pelo autor

Pacientes diagnosticados em estágios iniciais e adequadamente tratados apresentam bons resultados enquanto que o diagnóstico tardio pode levar a perda do enxerto (Montagner *et al.*, 2007).

❖ Avaliação de marcadores preditivos

Marcadores preditivos são aqueles que podem prever a resposta a uma determinada terapia. A correlação de biomarcadores por IHQ compõe protocolos de ensaios clínicos, podendo ser parte do critério de inclusão dos pacientes para detectar um alvo terapêutico ou mesmo monitorar a resposta terapêutica. (Alves *et al.*, 1999; Feldstein, 2010).

A expressão da molécula CD20 detectada por imuno-histoquímica em linfoma de células B, é fundamental para a escolha da terapia com Rituximab, um anticorpo monoclonal humanizado anti-CD20 utilizado em linfomas Não-Hodgkin (Cang *et al.*, 2012; Wada e Aozasa, 2012).

A perda da expressão da molécula CD 20 em recidiva do linfoma de células B tratados com Rituximab, faz com que estes pacientes se tornem refratários ao tratamento (Chu *et al.*, 2006; Wada e Aozasa, 2012).

A expressão da proteína KIT (CD117), codificada pelo proto-oncogene c-Kit, quando avaliada por IHQ está presente na maioria dos tumores estromais gastrintestinais- GISTs (Silva e Reidi, 2003).

Cerski (2010), encontrou em seu estudo positividade na IHQ para a proteína CD 117 em 97,6% dos casos, além de mutações localizadas no éxon 11 do gene c-Kit. Pacientes com esse perfil, com GISTs metastáticos e inoperáveis são sensíveis a quimioterapia alvo antitumoral com Imatinib (Glivec™) (Silva e Reidi, 2003; Cerski, 2010).

A tecnologia de humanização de anticorpos monoclonais terapêuticos originou uma nova classe de medicamentos, os biofármacos, que se estabeleceram de forma relevante, sobretudo no tratamento do câncer (Hsi, 2001; Marques, 2005).

No carcinoma de mama são avaliados por IHQ os fatores preditivos receptor de estrogênio, receptor de progesterona e HER2. Está recomendado também o uso do EGFR, citoqueratina 5 e Ki-67 (Gown, 2008; Cirqueira *et al.*, 2011).

A proteína HER2 (Fig. 8) é um receptor de fator de crescimento transmembrana normalmente expresso em células epiteliais. Encontra-se superexpressa em algumas neoplasias e particularmente no carcinoma da mama em associação com a amplificação do gene *HER2*.

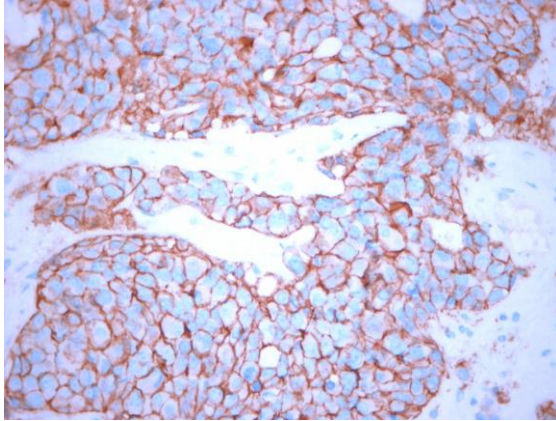


Fig. 8 Superexpressão de HER2

Fonte: Elaborado pelo autor

A amplificação do gene *HER2* em carcinoma da mama está associada a um pior prognóstico, no entanto o anticorpo monoclonal humanizado Trastuzumabe anti-HER/neu possui atividade inibitória contra as células do tumor que superexpressam a proteína HER2 (Eisenberg e Koifman, 2001).

O teste para determinar a superexpressão de HER2 possui alto valor preditivo pela eficácia de tratamentos que tem como alvo a molécula HER2. Somente pacientes com superexpressão de HER2 em mais de 10% do tumor invasivo ou com amplificação gênica por Hibridização *In Situ* são candidatos ao tratamento com o Trastuzumabe (Eisenberg e Koifman, 2001; Viale, 2012).

O Tamoxifeno é o tratamento padrão-ouro na terapia endócrina adjuvante em pacientes RE positivo (Fig. 9) aumentando substancialmente a sobrevida, reduzindo a recorrência tumoral e mortalidade (Early Breast Cancer Trialist's Collaborative group, 1998; Barlett *et al.*, 2011).

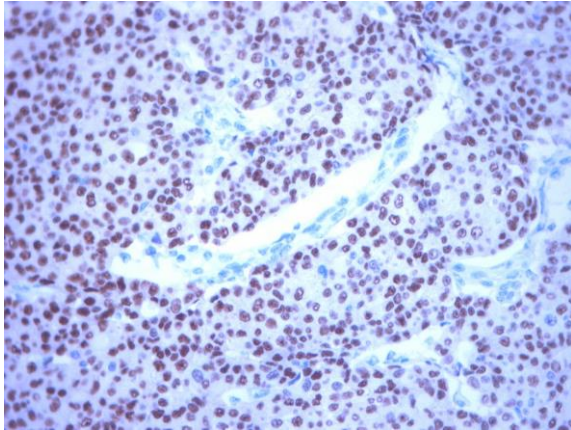


Fig. 9 Marcação positiva para receptor de estrógeno

Fonte: Elaborado pelo autor

1.3 Fatores que influenciam o teste Imuno-histoquímico (Fig.10)

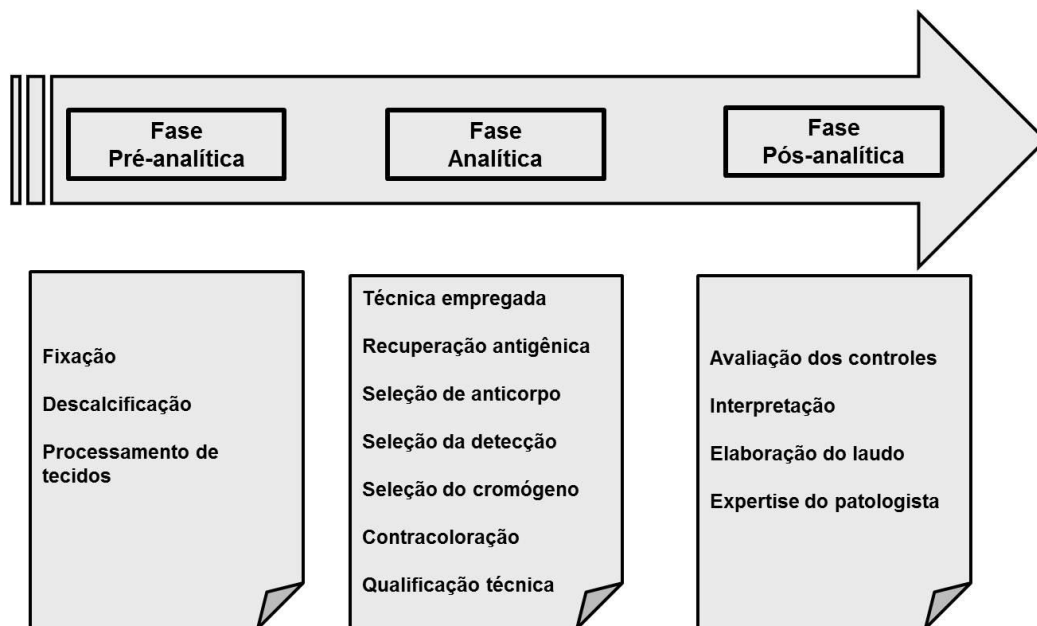


Fig. 10 Fatores que influenciam a imuno-histoquímica

Fonte: Elaborado pelo autor

1.3.1 Fase Pré-analítica

❖ Exame macroscópico

A macroscopia destina-se a reduzir as dimensões das amostras a uma espessura considerada adequada de cerca de 3 mm o que facilita a penetração do fixador e das substâncias utilizadas durante o processamento das amostras (Caputo *et al.*, 2010).

Esta análise compreende a identificação das estruturas anatômicas presentes, marcas de orientação, obtenção de medidas e peso da peça, além da identificação e posterior pintura das margens quando pertinente (Lester, 2010).

❖ Fixação

A remoção da amostra do paciente para o exame anátomo-patológico pode ser por biópsia, por cirurgia ou necropsia. A biópsia pode ser excisional- quando retira-se toda a lesão ou incisional- quando retira-se parte da lesão. As biópsias para diagnóstico podem ser endoscópicas, por curetagem, por agulha e/ou dirigidas por aparelhos (Brasileiro Filho, 1994; Caputo *et al.*, 2010).

A peça cirúrgica é oriunda de procedimento cirúrgico, que pode compreender a ressecção radical de um órgão principal e estruturas adjacentes como linfonodos e músculos (Brasileiro Filho, 1994).

Após a retirada da amostra do organismo vivo ela tende a iniciar o processo de autólise, que é progressiva e prejudicial a análise microscópica. No entanto, a fixação imediata da amostra em formalina tamponada 10%, pode interromper a autólise, motivo pelo qual o material obtido deve ser submetido a fixação o mais breve possível (Brasileiro Filho, 1994; Michalany, 1998; Caputo *et al.*, 2010). Uma

secção inicial, em peças maiores deve ser realizada também o mais breve possível (Goldstein *et al.*, 2007; Eisen, 2008; Jackson e Blythe, 2008; Taylor, 2013; Lin e Chen, 2014).

A fixação é influenciada por alguns fatores, o intervalo entre a colheita do material e a fixação deve ser o mínimo possível, o volume do fixador deve ser pelo menos de dez a vinte vezes o volume da amostra, quanto menor a espessura da peça mais eficiente é a fixação e por fim a escolha do fixador é crucial para a preservação dos espécimes (Brasileiro Filho, 1994; Michalany, 1998).

O tipo de fixador mais amplamente utilizado é formol 10% tamponado, pois apresenta baixo custo, é de fácil preparo e possibilita que várias técnicas como colorações especiais e imuno-histoquímica sejam aplicadas na amostra após a exposição ao fixador. O formol tem a característica de formar ligações cruzadas com as proteínas dos tecidos (Brasileiro Filho, 1994; Michalany, 1998; Titiford e Horenstein, 2005; Caputo *et al.*, 2010).

A fixação ideal para a realização da imuno-histoquímica deve combinar boa morfologia e antigenicidade, sendo a fixação imediata essencial para resultados consistentes, embora não exista um fixador ideal para a demonstração de todos os antígenos.

Variáveis como fixação tardia ou insuficiente afetam a coloração por causa perda de antigenicidade ou difusão dos antígenos. Esta última pode levar também a uma coloração de fundo. A fixação excessiva pode ser a causa de coloração negativa e a fixação não homogênea também pode levar a resultados insatisfatórios (Taylor *et al.*, 2006; Jackson e Blythe, 2008).

A duração da fixação é crítica, o tempo indicado é de no mínimo 8 horas não devendo exceder 24 horas. A padronização torna-se difícil por causa da velocidade de penetração do fixador que varia de acordo com o tamanho do fragmento. A falta de padronização de protocolos de fixação e processamento das amostras em diferentes instituições podem distorcer as conclusões a partir da IHQ. Os efeitos destas variáveis pré-analíticas podem levar de uma coloração de fundo inespecífica até alterações na prevalência de uma marcação. Aspectos relacionados a fixação que são capazes de impactar na IHQ são: fixação tardia, tipo de fixador, tempo de fixação e temperatura do ambiente (Hladick e White, 2008).

❖ **Descalcificação**

A seleção do descalcificador é determinada principalmente pela quantidade de tecido mineralizado no espécime e pela velocidade com que se pretende fazer a descalcificação. A qualidade da coloração pode ser afetada negativamente pelo processo de descalcificação prolongado em ácidos fortes como o ácido clorídrico (HCl). Muitos antígenos parecem não ser afetados de forma significativa pela descalcificação, embora a imuno-histoquímica para marcadores como Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) e Ciclina D1 em medula óssea possa ser problemática (Athanasou *et al.*, 1987; Miller, 2001).

❖ **Processamento das amostras**

O processamento das amostras de tecido é indispensável para que o material seja incluído em parafina. Os fragmentos retirados para a análise histopatológica contêm água impedindo que a parafina penetre nos tecidos, motivo pelo qual se realiza o processamento. Esta etapa também confere ao tecido a rigidez necessária

para que se realize o corte histológico fino o suficiente para a análise ao microscópio (Michalany, 1998; Caputo *et al.*, 2010; Lester, 2010).

Existem acentuadas diferenças no processamento de tecidos entre os laboratórios, a ausência de uma padronização pode refletir no resultado do exame imuno-histoquímico (Engel e Moore, 2011).

A primeira etapa no processamento é a desidratação do espécime. É necessário utilizar uma substância que seja solúvel em água, a mais utilizada na rotina histológica para este fim é o álcool etílico. Nesta etapa a água do tecido dá lugar ao etanol (Michalany, 1998; Caputo *et al.*, 2010; Lester, 2010).

Após a desidratação a etapa seguinte é chamada clarificação ou diafanização. Nesta etapa o etanol é substituído por um agente solvente da parafina o que torna a amostra receptiva ao meio de inclusão, pois a parafina não se mistura com o álcool etílico (Michalany, 1998; Caputo *et al.*, 2010; Lester, 2010).

A principal característica do agente clarificante é ser miscível com o agente desidratante e com o meio de inclusão, deve ter a capacidade de eliminar o álcool retido nas peças e dissolver a parafina, permitindo a impregnação. O agente clarificante mais utilizado é o xilol (Michalany, 1998; Caputo *et al.*, 2010; Lester, 2010).

A última etapa do processamento é a impregnação ou infiltração por parafina líquida a 60 °C. Como o agente diafanizador é solvente da parafina, para que se alcance um bloco de parafina de boa consistência o xilol deve ser totalmente eliminado da peça, devendo a peça ser infiltrada por uma parafina cada vez mais pura durante o processamento (Michalany, 1998; Caputo, 2010 *et al.*; Lester, 2010).

Após o processamento faz-se a inclusão do material em parafina líquida e após sua solidificação obtém-se o bloco de parafina. Para permitir a análise dos tecidos é necessário que se obtenham os cortes histológicos no micrótomo (Michalany, 1998; Caputo *et al.*, 2010).

Um estudo demonstrou que de antígenos de membrana das células T como CD3, CD4 e CD8 tem seus epítomos alterados por temperatura dos reagentes durante o processamento. Melhores resultados são obtidos quando se mantém a temperatura mais baixa durante a impregnação com parafina, indicando como favorável o uso de parafinas com ponto de fusão mais baixo (45 a 50 °C). Solventes e detergentes também podem causar alteração das proteínas por solubilização ou fluidificação da membrana lipídica (Pollard *et al.*, 1987).

A falta de padronização de protocolos de fixação e processamento das amostras em diferentes instituições podem distorcer as conclusões a partir da IHQ. Os efeitos destas variáveis pré-analíticas podem levar de uma coloração de fundo inespecífica até alterações na prevalência de uma marcação. As principais variáveis pré-analíticas capazes de impactar na IHQ são: fixação tardia, tipo de fixador, tempo de fixação, reagente e condição de desidratação, impregnação por parafina, secagem e armazenamento de lâminas (Engel e Moore, 2011).

1.3.2 Fase analítica

❖ Anticorpos em Imuno-histoquímica

Os anticorpos são proteínas plasmáticas solúveis e circulantes pertencentes a uma classe de proteínas denominada gamaglobulinas ou imunoglobulinas. Existem cinco tipos de anticorpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o anticorpo utilizado com maior

frequência na técnica de IHQ é do tipo IgG (Jackson e Blythe, 2008; Junqueira e Carneiro, 2013).

Antígenos são moléculas que induzem a formação de anticorpos e possuem uma ou mais regiões de ligação para os anticorpos conhecidas como determinantes antigênicos ou epítomos (Taylor *et al.*, 2006; Jackson e Blythe, 2008).

Cada anticorpo (Fig. 11) interage especificamente com o determinante antigênico (epítipo) que estimulou sua formação. Os anticorpos são sintetizados por células denominadas plasmócitos (Jackson e Blythe, 2008; Junqueira e Carneiro, 2013).

Na IHQ a identificação de moléculas em amostras de tecido é realizada por meio de interações antígeno-anticorpo, este reconhecimento torna-se possível pela estrutura tridimensional das proteínas (Taylor *et al.*, 2006; Jackson e Blythe, 2008).

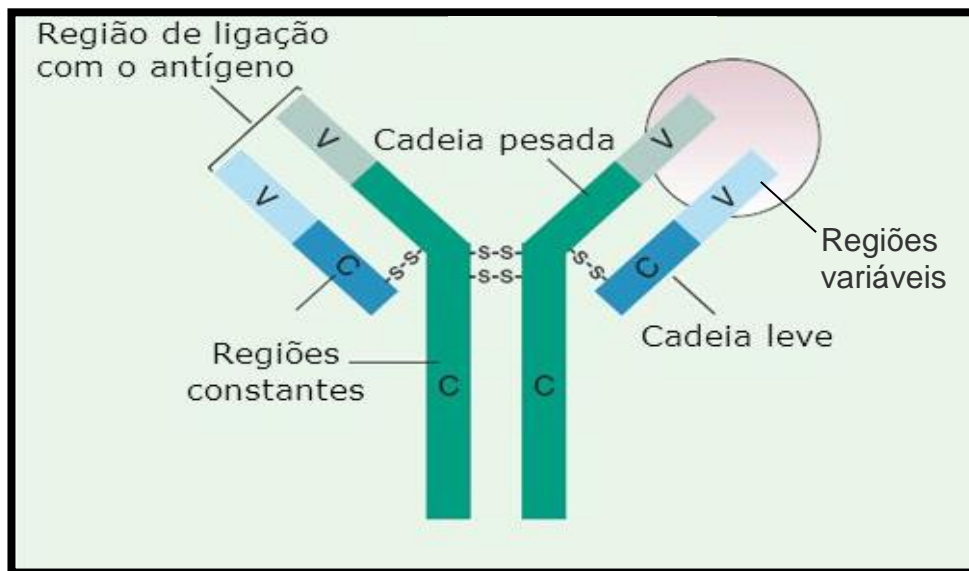


Fig. 11 Estrutura do anticorpo

Fonte: Modificado de <http://www.lookfordiagnosis.com>

/mesh_info.php?term=Sítios+de+Ligação+de+Anticorpos&lang=3

A molécula de anticorpo consiste em duas subunidades básicas: um par de cadeias leves (κ -k ou λ -l) e um par de cadeias pesadas (γ -g, α -a, μ -m, δ -d ou ϵ -e) (Taylor *et al.*, 2006; Janeway *et al.*, 2007).

A aplicação de anticorpos marcados com fluorescência para o estudo de moléculas em células e tecidos foi introduzida por Albert H. Coons e colaboradores em 1942 na demonstração de pneumococo em amostra hepática (Rosai e Ackerman's, 2004; Haines e West, 2005).

Em seu experimento Coons modificou o anti-soro (parte do sangue que contém anticorpos) para identificação de pneumococo conjugando a ele o isotocianato de fluoresceína, com isto introduzindo a técnica de Imunofluorescência para a demonstração de antígenos na qual o anticorpo usado é marcado com um corante fluorescente (Coons *et al.*, 1942; Haines e West, 2005; Janeway *et al.*, 2007;).

Desde então, avanços na metodologia incluindo a introdução de enzimas como a peroxidase e a fosfatase alcalina propiciaram a ascensão da técnica de IHQ. Entre as inovações estão a simultânea avaliação da coloração IHQ e detalhada morfologia tecidual e a possibilidade do uso do microscópio de luz no lugar do microscópio de fluorescência (Haines e West, 2005; Jackson e Blythe, 2008).

❖ **Anticorpos monoclonais x Anticorpos policlonais**

A quantidade de anticorpos disponíveis para uso em tecido fixado aumentou exponencialmente. Esta introdução contínua de novos anticorpos nos laboratórios contribui para a expansão da técnica de IHQ. As características de sensibilidade e especificidade são fundamentais em anticorpos primários. Os anticorpos utilizados

na técnica IHQ podem ser monoclonais ou policlonais (Brasileiro Filho, 1994; Chetty *et al.*, 1995; Nielsen, 2013).

O anticorpo liga-se especificamente à proteína e sua localização pode ser evidenciada, por microscopia de luz, utilizando-se um sistema de detecção. Uma das exigências da técnica é a disponibilidade de um anticorpo contra a proteína que se pretende detectar (Alberts *et al.*, 1999).

A obtenção de anticorpos policlonais é através da imunização de um animal com uma molécula específica denominada imunógeno. Na resposta imune do animal imunizado vários grupos (clones) de células plasmáticas podem reconhecer porções diferentes do antígeno (epítomos) e produzir contra elas anticorpos diferentes. A mistura de moléculas de diferentes especificidades que se ligam a diferentes epítomos do imunógeno constitui o que se chama de anticorpo policlonal (Fig. 12) (Janeway *et al.*, 2007; Jackson e Blythe, 2008; Junqueira e Carneiro, 2013).

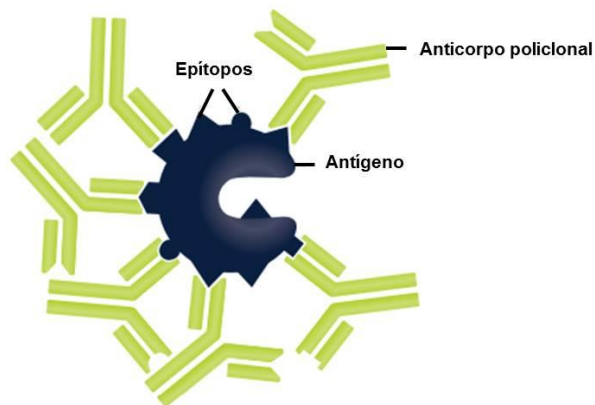


Fig. 12 Anticorpo policlonal ligado a mais de um epítopo do antígeno

Modificado de: <http://www.dako.com/br/ihc-guidebook-antibodies-appendix-a.pdf>

Estes anticorpos obtidos são bastante heterogêneos e podem apresentar reações cruzadas com outras moléculas, havendo a necessidade da produção de

anticorpos com estrutura homogênea e especificidade conhecida (Janeway *et al.*, 2007; Jackson e Blythe, 2008).

Georges Köhler e Cesar Milstein desenvolveram a técnica do Hibridoma combinando a habilidade das células plasmáticas para a produção de um anticorpo específico com a imortalidade *in vitro* de uma linhagem celular de Mieloma, um tumor de células plasmáticas (Janeway *et al.*, 2007; Jackson e Blythe, 2008).

A fusão de células imunizadas com as células do Mieloma resultou no Hibridoma, células híbridas que proliferam ilimitadamente e secretam anticorpos específicos contra o antígeno usado para imunizar o doador das células (Fig. 13) (Janeway *et al.*, 2007; Jackson e Blythe, 2008;).

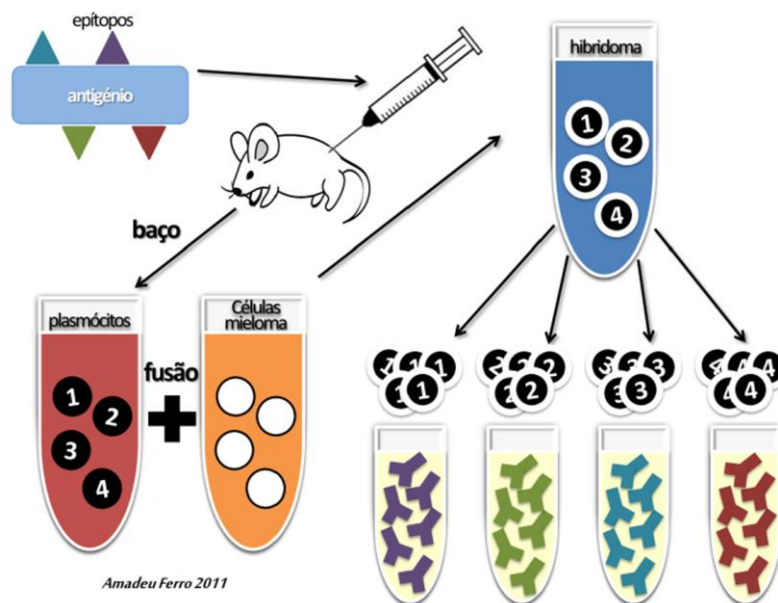


Fig. 13 Produção de anticorpos monoclonais

Fonte: <http://amadeuferro.webs.com/documentos/texto%20total%20v2.4a.pdf>

Os anticorpos produzidos por cada hibridoma são moléculas idênticas de especificidade conhecida e são chamados monoclonais (Fig 14). Estes anticorpos

são empregados em ensaios sorológicos, para diagnóstico e até como agentes terapêuticos (Janeway *et al.*, 2007; Jackson e Blythe, 2008).

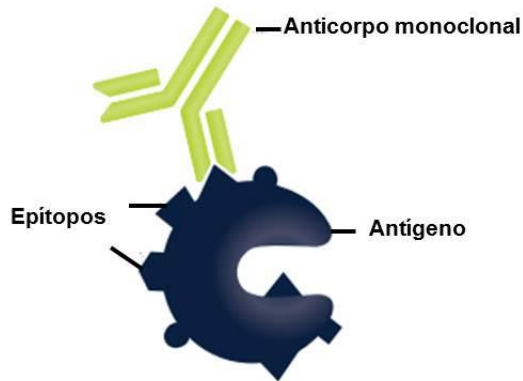


Fig. 14 Anticorpo monoclonal

Modificado de: <http://www.dako.com/br/ihc-guidebook-antibodies-appendix-a.pdf>

Embora a maior parte da produção de anticorpos monoclonais ocorra em camundongo, um número cada vez maior deste tipo de anticorpo tem sido produzido em coelho. O processo para gerar um hibridoma de coelho é comparável com o hibridoma de camundongo (Boenisch, 2013).

A utilização de coelhos na produção de anticorpos monoclonais confere algumas vantagens sobre monoclonais de camundongo. Anticorpos monoclonais de coelho anti-RE (clone SP1) e anti-RP (clone SP2) mostram maior sensibilidade na IHQ do que monoclonais de camundongo, além permitirem diluições mais elevadas (Rocha *et al.*, 2008; Boenisch, 2013).

O anticorpo monoclonal anti-HER2 de coelho (clone 4B5) tem excelente especificidade, sensibilidade e boa correlação com a técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH- *Fluorescence In Situ Hybridization*). O clone 4B5 apresentou coloração na membrana plasmática mais nítida e proporcionou menos coloração de fundo do que o monoclonal de camundongo (clone CB11) (Powell *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais, como fonte de reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos teciduais ou celulares foi marcante na evolução da imuno-histoquímica (Werner *et al.*, 2005).

❖ Propriedades dos anticorpos

O anticorpo é o reagente central nas técnicas de IHQ, portanto é útil ter um conhecimento básico sobre esta proteína (Tab. 3), suas potencialidades e limitações. A ligação antígeno-anticorpo é mantida por uma combinação de fatores como pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas e forças de Van Der Waals (Jackson e Blythe, 2008; Boenish, 2013).

Tabela 3 Propriedades dos anticorpos

Afinidade	Força de ligação de uma molécula a outra, como a ligação entre o anticorpo e seu epítipo específico.
Avidez	Soma da força de ligação de mais de uma molécula em mais de um sítio de ligação.
Especificidade	Característica do anticorpo de ligar-se seletivamente a um único epítipo do antígeno.
Sensibilidade	Quantidade de antígeno que o anticorpo é capaz de detectar.

Afinidade dos anticorpos

É a força de ligação de uma molécula à outra em um único sítio, tal como a ligação antígeno-anticorpo (Janeway, 2207).

Na IHQ a afinidade funcional de um anticorpo pode ser definida pelo tempo necessário para o anticorpo atingir o equilíbrio com o antígeno da amostra. O anticorpo que atinge o máximo de ligações tem maior afinidade (Boenish, 2013).

O complexo antígeno-anticorpo formado durante a IHQ é reversível, podendo dissociar-se durante os ciclos de lavagem, porém anticorpos de elevada afinidade apresentam menor probabilidade de dissociação (Boenish, 2013).

Avidez

Para anticorpos policlonais (anti-soro heterogêneo) fala-se em avides, que é a soma total da força de ligação das interações entre um antígeno e os anticorpos que o reconhecem. A ligação de múltiplos sítios aumenta a força de ligação funcional total. (Janeway, 2007; Jackson e Blythe, 2008).

Reatividade cruzada dos anticorpos

A reação cruzada ocorre quando um anticorpo reage com um antígeno que não evocou a resposta humoral (Fig.15), (Boenish, 2013).

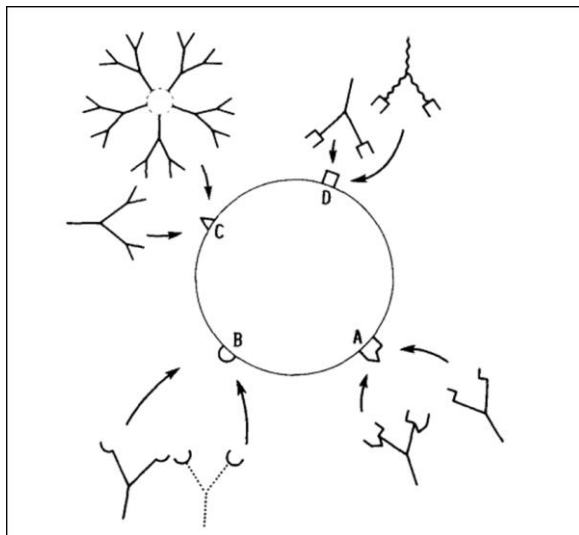


Fig.15 Anticorpos diferentes reagindo com epítomos de um antígeno.

Fonte: Campbell AM. General properties and applications of monoclonal antibodies

Pode referir-se a interação de um anticorpo e um antígeno quando o determinante antigénico está presente em outras moléculas (epítopo compartilhado), ou ainda quando os epítopos são diferentes, porém apresentam alguma semelhança que permite a ligação (epítopo semelhante) (Fig.16) (Campbell, 1984; Janeway, 2007).

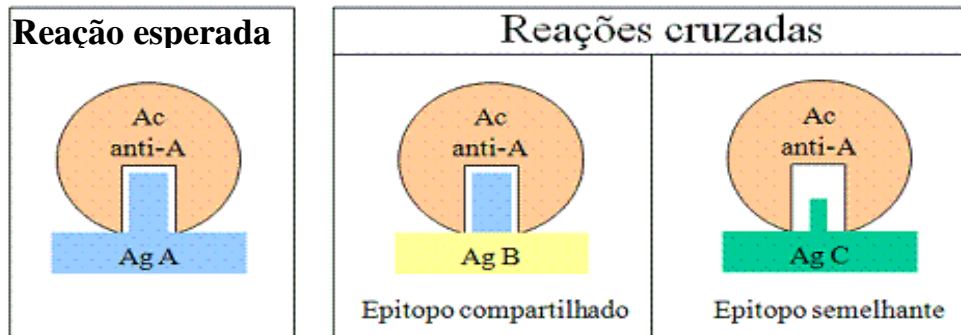


Fig.16 Reatividade cruzada

Fonte: Modificado de <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/immuno-port-chapter7.htm>

Taxa de reação dos anticorpos

A reação antígeno-anticorpo que ocorre na IHQ raramente se dá em condições ideais. O uso de um anticorpo primário de alta afinidade e em concentração elevada aumenta a velocidade de reação permitindo períodos curtos de incubação. Tamanho e forma da molécula do anticorpo parecem não ter relevância na penetração na amostra, entretanto uma fixação excessiva pode dificultar a penetração do anticorpo (Boenish, 2013).

❖ Estabilidade dos anticorpos

Geralmente a estabilidade dos anticorpos concentrados ou pré-diluídos é demonstrada por testes pelo fabricante durante um período de tempo pré-determinado. Anticorpos concentrados possuem maior prazo de validade do que anticorpos prontos para uso. Anticorpos concentrados podem ser aliquotados e

armazenados em freezer -80 °C, permitindo um armazenamento por tempo indeterminado. Reagentes prontos para uso, incluindo anticorpos devem ser armazenados em uma temperatura de 2-8 °C (Hladick e White, 2008; Boenish, 2013).

A temperatura de armazenamento do anticorpo também indicada pelo fabricante é crítica para a sua estabilidade. O monitoramento diário das temperaturas de armazenamento deve ser documentado. Alterações de temperatura em geladeira e freezer podem inativar os reagentes (Hladick e White, 2008; Boenish, 2013).

Não raramente as condições de armazenamento deste reagente no laboratório do usuário não são idênticas às do teste do fabricante. A possibilidade de condições adversas de armazenamento após a compra do produto, justifica a responsabilidade limitada do fabricante. O uso de anticorpos com prazo de validade expirado não é recomendado (Hladick e White, 2008; Boenish, 2013).

❖ **Seleção do anticorpo**

A lista de novos anticorpos disponíveis para IHQ cresce rapidamente com a descoberta de novos biomarcadores e com o auxílio de técnicas moleculares (Lin e Chen, 2014).

Muitos anticorpos são introduzidos na rotina dos laboratórios pela leitura de publicações científicas e pelo desenvolvimento contínuo de anticorpos novos e melhores por parte dos fabricantes. Na aquisição de anticorpos algumas questões devem ser respondidas: Por que precisamos deste anticorpo? Qual a aplicação clínica deste anticorpo? Este anticorpo tem um novo alvo, ou está substituindo outro já existente? Qual a sensibilidade e a especificidade deste anticorpo? Qual o volume

necessário? Existe mais de um clone para este marcador? (Nielsen, 2013; Lin e Chen, 2014).

Anticorpos monoclonais são muito utilizados por causa de sua especificidade. Anticorpos policlonais frequentemente apresentam maior sensibilidade que os monoclonais, possuindo a capacidade de minimizar o impacto de uma fixação insatisfatória. No entanto, por reconhecer mais de um epítopo o risco de ligação cruzada com outra proteína é maior (Nielsen, 2013).

❖ **Padronização do anticorpo**

As recomendações fornecidas pelo fabricante serão a base para os testes do novo anticorpo, estas podem ser acessadas na consulta as bulas. Informações quanto ao controle positivo adequado, método de recuperação antigênica, diluição, tempo de incubação, a origem do anticorpo (camundongo, coelho, cabra...), a localização do antígeno alvo, a concentração da proteína, a classificação do anticorpo (se reagente para análise, se para pesquisa ou se para diagnóstico *in vitro*). (Goldstein *et al.*, 2007; Hladick e White, 2008; Lin e Chen, 2014).

É recomendado aos laboratórios de diagnóstico que se faça uso de anticorpos classificados como “para diagnóstico *in vitro*” (IVD- *in vitro diagnostic*), neste caso o vendedor se responsabiliza pela validação e aplicação do anticorpo. Nem sempre este tipo de reagente está disponível, no caso de adquirir anticorpos para pesquisa (RUO – *Research Use Only*) ou reagente para análise (ASR – *Analyte Specific Reagent*) o laboratório é o responsável por testar, validar e documentar a reatividade do anticorpo (Hladick e White, 2008).

Algumas recomendações para otimização do anticorpo são: utilizar no teste pelo menos dois tipos de solução tampão, cinco concentrações diferentes do

anticorpo, incluindo uma diluição abaixo e uma acima da indicada pelo fabricante, dois tempos de incubação no cromógeno (Goldstein *et al.*, 2007).

A diluição ideal é determinada, principalmente, pela quantidade absoluta de anticorpos específicos presentes e pela afinidade do anticorpo. A quantidade de anticorpo requerida para uma coloração satisfatória tem de ser determinada por diferentes diluições (Boenisch, 2013).

Para anti-soros policlonais a quantidade de anticorpos específicos não é mensurável, deve-se realizar uma série de diluições até que se encontre o título. Na titulação de anticorpos monoclonais a concentração absoluta de anticorpos específicos pode ser determinada, informação útil para a titulação (Boenisch, 2013).

❖ **Validação interna do anticorpo**

Ao receber um anticorpo é necessário validá-lo antes de realizar um exame, abaixo seguem algumas recomendações para validação (Goldstein *et al.*, 2007; Lin e Chen, 2014):

- Testar pelo menos 10 amostras positivas e dez amostras negativas, se o marcador não for um fator preditivo e se for um marcador preditivo é necessário testar 20 amostras positivas e 20 negativas.

- Um novo teste deve ter alto nível de concordância (90%) com o teste já validado se existir. Quando possível utilizar na validação o controle fixado com o mesmo fixador e método de processamento que o material do paciente.

- Revalidar o teste sempre que houver mudanças no procedimento.

- Revalidar novos lotes do anticorpo a medida que chegam ao laboratório, testando três amostras: uma com alto nível de expressão do antígeno, uma com nível intermediário a baixo de expressão e uma sem o antígeno de interesse.

- Na validação incluir algum material que tenha passado pelo processo de descalcificação.

- Utilizar microarranjo de tecidos (TMA-*Tissue microarray*) contendo material neoplásico e material normal, fixados e processados de forma idêntica na validação.

- Documentar a validação.

❖ **Escolha do método imuno-histoquímico**

A técnica pode ser realizada manualmente ou utilizando-se algum equipamento. A opção pela automação possibilita o aumento da reprodutibilidade da coloração, entretanto muitos laboratórios ainda optam pela técnica manual (Hladik e White, 2008; Taylor, 2013).

A precisão do diagnóstico final é reflexo da efetividade de todos os passos sequenciais. Quando se opta por um sistema de semi-automatização, o passo não automatizado permanece sujeito a erro humano. É desejável que o profissional possua um conhecimento das relações entre as reações químicas entre reagentes e efeitos de temperatura e pH para resolução de problemas durante a técnica (Nakhleh, 2006; Hladick e White, 2008).

A falta de reprodutibilidade da técnica IHQ intra-laboratorial e inter-laboratorial na fase analítica pode ser atribuída principalmente a qualidade dos reagentes utilizados e aos protocolos usados (Lars *et al.*, 2013).

Existem inúmeras opções de plataformas de automação no mercado, seus pontos fortes e fraquezas devem ser avaliados, algumas opções são: Ventana Benchmark Ultra (*Ventana Medical Systems*, Tucson, Arizona), Leica Bond III (*Leica Biosystems*, Buffalo Grove, Illinois), Dako Omnis (*Dako North America*, Carpinteria, California) e Biocare Intellipath (*Biocare Medical*, Concord, Massachusetts). Alguns dos parâmetros que devem ser considerados na escolha do sistema de automação devem ser a facilidade de utilização, a capacidade de lâminas, o tempo de reação, a quantidade de reagentes necessários e a flexibilidade quanto a escolha do anticorpo primário (Lin e Chen, 2014).

❖ **Recuperação antigênica**

A fixação das amostras com fixadores a base de formaldeído promove a formação de pontes aldeído-proteína que podem alterar a forma, destruir ou mascarar alguns epítomos. A recuperação antigênica é a etapa na técnica de IHQ que destina-se a eliminar estas ligações e expor o epítomo do antígeno (Ezaki, 2000).

A técnica de recuperação de epítomos por calor é considerada um enorme avanço na IHQ. Cabe ressaltar que não são todos os anticorpos que necessitam de recuperação por calor ou enzimática. Se a coloração IHQ é satisfatória sem as técnicas de recuperação do antígeno é provável que fique pior após a recuperação, podendo significar que a estrutura antigênica é formalina-resistente, ou seja, não se modifica após a fixação com formaldeído (Alves *et al.*, 1999; Eisen, 2008).

Para muitos antígenos qualquer tipo de aquecimento (micro-ondas, banho-maria, panela de pressão) produzem resultados similares desde que ajustado o tempo de recuperação antigênica (Shi e Taylor, 2013).

O valor do pH da solução de recuperação antigênica influencia os resultados, alguns antígenos/clones mostram uma diminuição na intensidade da recuperação antigênica em valores de pH entre 3,0 a 6,0, e as soluções de pH entre 8,0 a 9,0 produzem bons resultados para a maioria dos antígenos. As plataformas de automação em IHQ utilizam soluções de recuperação antigênica padronizadas, pré-diluídas uma solução de pH 9,0 e outra de pH 6,0 (Shi e Taylor, 2013).

A padronização da recuperação antigênica por calor passa pela definição do método de aquecimento, da solução a ser utilizada, do pH da solução, da temperatura e do tempo de exposição ao tampão desde o aquecimento até o resfriamento da solução tampão (Hladick e White, 2008).

Poucos anticorpos beneficiam-se de uma recuperação de epítopos exclusivamente por digestão enzimática. A concentração da enzima depende de suas propriedades proteolíticas. A concentração, o pH e a temperatura são constantes numa mesma enzima, porém o tempo de exposição da amostra submetida a digestão pode variar e depende de fatores como: antígeno em questão, capacidade da enzima usada e do tempo de fixação empregado na amostra (Goldstein *et al.*, 2007; Jackson e Blythe, 2008; Hladick e White, 2008; Pace, 2013).

É comum encontrar nos laboratórios uma mistura de tecidos fixados insuficientemente e tecidos super-fixados, o que traz muitos problemas de resultados inconsistentes na IHQ. A falta de padronização de fixação dificulta a recuperação antigênica satisfatória (Goldstein *et al.*, 2007).

❖ Métodos de detecção

Para que a ligação do anticorpo ao antígeno seja visível é necessário um complexo marcado com enzima para a imunoreatividade final (Hladick e White, 2008).

No método imuno-histoquímico direto o anticorpo primário está conjugado a uma substância marcadora, seja um fluorocromo ou uma enzima, no entanto a amplificação é pequena, estando o uso da técnica mais restrito a tecidos congelados. Na IHQ direta pode se fazer uso do polímero de uma etapa (*EPOS-Polymer one-step staining* da Dako®), onde o anticorpo primário marcado com peroxidase está ligado a um polímero dextrano amplificando o sinal (Jackson e Blythe, 2008).

No método imuno-histoquímico indireto utiliza-se um segundo anticorpo marcado para o reconhecimento do anticorpo primário ligado ao antígeno. Os marcadores mais utilizados são enzimas que quando incubadas com o cromógeno produzem como resultado final um precipitado estável colorido visível na microscopia de luz (Jackson e Blythe, 2008; Petersen e Pedersen, 2013).

O uso de uma variedade de enzimas em combinação com diferentes cromógenos possibilita escolher a cor deste produto final. A combinação mais utilizada é o uso da peroxidase do rábano silvestre (HRP) com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB), produzindo como produto de reação final um precipitado marrom (Fig.17) (Jackson e Blythe, 2008).

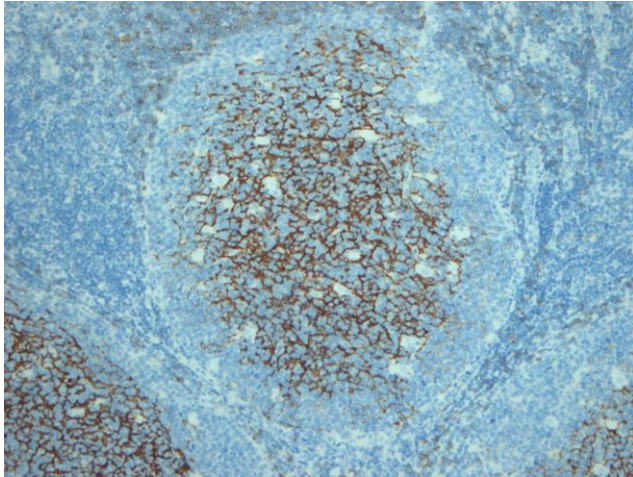


Fig.17 Coloração com cromógeno DAB em Linfonodo

Fonte: Elaborado pelo autor

❖ **Imuno-histoquímica com Biotina**

Um dos métodos de detecção baseia-se na afinidade que a streptavidina (da bactéria *Streptomyces avidinii*) e avidina possuem pela vitamina biotina formando com esta complexos como: avidina/biotina (Kit ABC) ou streptavidina marcada com biotina (Kit LSAB). Estes complexos oferecem um desafio quando as amostras contêm biotina endógena como, por exemplo, o fígado (Hladick e White, 2008; Petersen e Pedersen, 2013).

❖ **Imuno-histoquímica com polímeros**

A introdução de polímeros ou sistemas de base sintética permitiu a eliminação de coloração não-específica pela presença de biotina endógena. O polímero é uma estrutura onde os anticorpos e as enzimas são ancorados. Alguns polímeros, devido ao seu tamanho podem ter dificuldade em chegar até o antígeno dependendo de sua localização (Hladick e White, 2008; Petersen e Pedersen, 2013).

Na técnica indireta de dois passos: utiliza-se um anticorpo secundário marcado contra a imunoglobulina da espécie animal onde foi feito o anticorpo primário. Método com maior sensibilidade que amplifica o sinal (Jackson e Blythe, 2008).

Na técnica indireta de dois passos com cadeia de polímero: utiliza-se o anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase ligados a um polímero (dextrano) em cadeia. Os anticorpos ligados ao polímero são anti-camundongo e anti-coelho (Jackson e Blythe, 2008).

❖ **Seleção do cromógeno**

Alguns cromógenos utilizados são DAB (marrom), *Fast Red* (vermelho), AEC (vermelho) e cromógeno Azul (Petersen e Pedersen, 2013).

Cromógenos usados com fosfatase alcalina são sensíveis a luz e mais suscetíveis a evanescer, já os cromógenos para peroxidase são mais duradouros. A filtração do cromógeno reduz artefatos de precipitação (Hladick e White, 2008).

Sendo o cromógeno DAB considerado cancerígeno, ele deve ser manipulado com cautela e deve haver a busca por cromógenos alternativos, e/ou preparos em que o usuário possa ter o menor contato possível com o cromógeno.

Histogreen é um substrato da peroxidase, cujo produto da reação é verde, e apresenta a vantagem de não ser tóxico, podendo ser uma alternativa ao DAB, a medida que demonstra igual sensibilidade na localização da imunorreação (Tomas, 2005).

No entanto, o Histogreen apresenta uma coloração grosseira, granulada e por vezes dispersa, o que não impede a localização das estruturas que apresentaram

imunorreatividade ou a visualização de detalhes celulares, mas o seu produto da reação é consideravelmente menos estável em álcool e água do que DAB o que pode restringir sua aplicação (Tomas, 2005).

A utilização do cromógeno DAB, que tem como produto um precipitado marrom, não é adequada para análise IHQ de neoplasias melanocíticas, com melanina abundante (Kamiro e Tam, 1991).

1.3.3 Fase Pós-analítica

❖ Interpretação dos resultados

Alguns dos fatores que afetam a interpretação da IHQ são: a análise de biópsia x grande espécime de ressecção, a quantidade de antígeno nas amostras, a sensibilidade do anticorpo primário e a intensidade da coloração do controle positivo (Lin e Chen, 2014).

Não existe um único sistema de pontuação para coloração IHQ, os sistemas existentes possuem dois componentes: a proporção de antígeno-alvo marcado e a intensidade da imunomarcação. Em geral a marcação nuclear é mais confiável do que a citoplasmática (Goldstein *et al.*, 2007; Lin e Chen, 2014).

❖ Elaboração do laudo imuno-histoquímico

São elementos importantes para a elaboração do laudo de IHQ: anticorpo, resultado, clone, localização do antígeno, tipo de expressão do antígeno (granular, linear, *dot*, homogênea), localização anatômica do espécime e tecido, número do bloco de parafina, o sistema de escore aplicado e o ponto de corte para o resultado positivo (Goldstein *et al.*, 2007; Lin e Chen, 2014).

É importante a padronização dos termos utilizados no laboratório e a comunicação com o médico oncologista, incluindo a terminologia diagnóstica. É de responsabilidade do laboratório a revisão constante e a atualização das classificações e da terminologia diagnóstica. A expertise do patologista na precisão de resultados positivos ou negativos, e a avaliação diária da qualidade da coloração são imprescindíveis (Nakhleh, 2006; Hladick e White, 2008).

1.4 Controle de qualidade em Imuno-histoquímica

A introdução da IHQ acarretou grandes avanços ao diagnóstico histopatológico, motivando o uso cada vez mais amplo do método, o que pode trazer certo grau de heterogeneidade nos procedimentos e resultados (Alves *et al.*, 2004).

Muitos fatores contribuem para as divergências que podem ocorrer entre os exames imuno-histoquímicos como: emprego de anticorpos diversos (clones diferentes), a não uniformidade de sistemas de detecção, uso de sistemas de amplificação de alto desempenho, métodos diversos de recuperação antigênica e inclusive diferentes definições de imunorreatividade (Barra, 2006).

A seleção do painel de anticorpos a ser utilizado é um dos aspectos mais relevantes para a melhor aplicabilidade da técnica no diagnóstico. Os principais quesitos para a garantia de qualidade em IHQ são a correta indicação de cada caso para este exame, um adequado contexto clínico-morfológico, a seleção de anticorpos para compor um painel diagnóstico, a seleção da metodologia mais adequada, a padronização da técnica e a interpretação pelo patologista (Alves *et al.*, 1999).

Os resultados do exame imuno-histoquímico podem ser divididos em dois grupos principais 1) testes qualitativos: compreendem a maioria dos testes, são

aqueles em que o resultado da coloração é interpretado como negativo ou positivo, podendo envolver alguma quantificação na forma de um ponto de corte baseado em uma porcentagem de células para que o resultado seja positivo. 2) testes semi-quantitativos são interpretados de acordo com uma pontuação ou escore, refletindo a expressão do antígeno através da intensidade e distribuição da coloração bem como a porcentagem de células positivas (Lars *et al.*, 2013).

Um protocolo ideal deve ser capaz de minimizar a variação analítica do teste, também deve ser capaz de garantir a correta visualização do antígeno na amostra que apresenta alto ou baixo nível de expressão (Lars *et al.*, 2013).

Na IHQ uma coloração uniforme em todas as células (falta de heterogeneidade da coloração entre as células), pode ser indicativo de um resultado falso positivo. É importante observar que na amostra analisada existe heterogeneidade entre células individualmente e uma coloração totalmente marrom não é necessariamente positividade (Eisen, 2008).

A coloração de fundo ou uma coloração não esperada em algumas células devem ser um alerta de resultados falso-positivos, geralmente ligados à diluição incorreta do anticorpo primário, ao tipo de recuperação antigênica ou ao sistema de detecção (Eisen, 2008).

A responsabilidade indelegável do patologista quanto à interpretação, reside especialmente em identificar quais células exibem reatividade para o antígeno, as alterações morfológicas nas células reativas, bem como a distribuição intra-celular do antígeno, em comparação com os padrões já relatados na literatura para cada molécula (Alves *et al.*, 1999).

❖ Testes de proficiência

Existem programas específicos para avaliação externa de qualidade em IHQ, os maiores e mais conceituados são desenhados pela CAP (*College of American Pathologists*) e a ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) nos Estados Unidos e existem o UK-NEQUAS (*United Kingdom National Quality Assessment Service*) e NordicQC (*Nordic quality Control*) no Reino Unido (Eisen, 2008; Taylor, 2013; College of American Pathologists, 2015).

A CAP certifica laboratórios que participem de sua avaliação externa de controle de qualidade. No teste de proficiência, o laboratório participante deve receber da CAP lâminas para IHQ, realizar a técnica e submeter a avaliação da CAP (Lin e Chen, 2014; CAP, 2014).

O programa permite o teste de proficiência para muitos marcadores: MK (IHQ geral), PM3 (CD20), PM5 (avalia marcadores como ciclina D1, CDX2, CD30, D240, CK20, Ki67, Pax2, Pax8 e P63), possui teste para os marcadores preditivos e HER2 (mama) GHER2 (HER2 gástrico), PM2 (receptor de estrógeno e receptor de progesterona) (Lin e Chen, 2014; CAP, 2014).

O check list da CAP pode ser usado como um guia aos laboratórios garantindo o mínimo de padronização na IHQ. Neste documento existem orientações desde a fixação e processamento dos espécimes, manutenção e monitoramento de instrumentos e equipamentos, uso de controles, seleção de metodologia e reagentes, uso do Procedimento operacional padrão (POP) até como reportar os achados imuno-histoquímicos (CAP, 2014).

❖ **Uso de controles em Imuno-histoquímica**

A validação dos achados requer a verificação dos padrões de reatividade do marcador em um tecido de referência. Tradicionalmente são usados como controles positivos, aqueles que possuem uma expressão conhecida. A escolha da amostra apropriada deve começar pela análise das especificações que o fabricante fornece (Hladick e White, 2008; Colley e Stead, 2013).

Controle Positivo: o controle positivo deve ser utilizado em cada coloração preferencialmente na mesma lâmina onde está o tecido do paciente, este controle pode ser um tecido tumoral ou normal desde que contenha expressão da proteína que será identificada pela IHQ (Eisen, 2008; Hladick e White, 2008).

É recomendado que a amostra seja processada de forma idêntica ao espécime em teste e que apresente uma expressão moderada do antígeno (Boenisch *et al.*, 2002).

Controle Negativo: a amostra que servirá de controle negativo deve ser processada de forma idêntica ao espécime em teste e não conter o antígeno que será pesquisado. O propósito do uso deste tipo de controle é detectar qualquer marcação aberrante devido ao procedimento de recuperação antigênica, anticorpo secundário ou cromógeno (Boenisch *et al.*, 2002; Eisen, 2008).

Controle interno: a amostra do paciente em que está sendo realizada a IHQ pode conter células ou estruturas que possuam o antígeno pesquisado também nas estruturas do tecido normal adjacente (Boenisch *et al.*, 2002).

1.5 Protocolo da Imuno-histoquímica

Com o objetivo de demonstrar a existência de proteínas em amostras de tecido utilizando anticorpos, muitos protocolos de IHQ podem ser utilizados. O protocolo da IHQ pode ser resumido nos passos a seguir (Alves *et al.*, 1999; Ramos-Vara, 2005; Jackson e Blythe, 2008).

❖ **Corte histológico:** o corte histológico é realizado no micrótomo, regulado em 3 μm a partir de material incluído e embocado em parafina. A fita obtida no corte ao micrótomo deve ser colocada em banho-maria histológico e os cortes depositados em lâminas próprias para a técnica de IHQ. Para a técnica manual, a lâmina na qual o corte é colocado é previamente tratada com 3-aminopropiltrietoxisilano a 4% em acetona, para melhor adesão da secção.

❖ **Adesão do corte:** com a finalidade melhorar a adesão do corte a lâmina é recomendada a incubação da lâmina após o corte em micrótomo *overnight* em estufa a 37 °C.

❖ **Desparafinização:** as lâminas podem ser colocadas em estufa a 60 °C por uma hora para tornar a parafina líquida e posteriormente passadas pelo xilol, solvente da parafina, por mais 15 minutos.

❖ **Reidratação:** após o xilol as lâminas devem passar por álcool etílico graduado 99%, 95%, 80% e o último de 70% até a água destilada;

❖ **Recuperação antigênica**

- a) Método proteolítico enzimático: quando são utilizadas enzimas como tripsina, protease, pepsina, pronase, proteinase K (Alves *et al.*, 1999; Shi e Taylor, 2013).
- b) Recuperação antigênica mediada por calor: empregando equipamentos como micro-ondas, panela de pressão, steamer, banho-maria, PT Link

(*Pre-Treatment Module for Tissue Specimens*)- Dako, associados as tampões como citrato de sódio pH 6,0, EDTA pH 8,0, e Tris-EDTA pH 9,9 ou Tris-EDTA pH 10 (Alves *et al.*, 1999; Jackson e Blythe, 2008; Shi e Taylor, 2013).

❖ **Bloqueio da peroxidase endógena**

Requerida quando o kit de detecção utilizado contém a enzima peroxidase. Este bloqueio é realizado através da saturação da peroxidase endógena com seu substrato (peróxido de hidrogênio). Para que esta saturação ocorra as lâminas com as amostras são incubadas em uma solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol (Alves *et al.*, 1999; Jackson e Blythe, 2008);

❖ **Incubação das lâminas com anticorpo primário**

Incubar com anticorpo específico contra o antígeno a ser pesquisado, diluído em diluente de anticorpo. Realizada em 30 minutos a 37 °C ou *overnight* (duração aproximada de 14 horas) a 4 °C em câmara úmida;

❖ **Detecção e cromógeno**

Os sistemas de detecção permitem a visualização do local da ligação antígeno-anticorpo. Através destas técnicas imuno-enzimáticas a reação com um substrato cromogênico incolor produz um produto final colorido.

O kit de detecção contém enzimas sendo a mais utilizada comum a peroxidase. Também podem ser utilizados os complexos peroxidase-anti-peroxidase (PAP), avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC). Enzimas ligadas a polímeros conjugados a anticorpos secundários tendem a eliminar colorações não-específicas.

As lâminas devem ser incubadas no cromógeno de escolha, o mais utilizado é diaminobenzidina-DAB a 37 °C ao abrigo da luz, o desenvolvimento de precipitado castanho é o produto final da reação;

❖ **Contra-coloração e diferenciação**

A contra-coloração é realizada com hematoxilina, possibilitando a visualização das estruturas além das que estiverem já coradas pelo cromógeno de escolha. A diferenciação é realizada com água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônia a 2%), com a finalidade de tornar corte histológico azulado, possibilitando o contraste adequado na interpretação da coloração marrom obtida com a aplicação do cromógeno. Após esta etapa as lâminas devem ser desidratadas e montadas com resina sintética e lamínula.

1.6 Automação em Imuno-histoquímica

À medida que o número de lâminas na IHQ aumenta a reprodutibilidade e a qualidade podem diminuir. A automação deve permitir que ocorra um aumento significativo na produtividade do laboratório, da reprodutibilidade e qualidade, além da padronização o que permite melhor comparação inter-laboratorial (Riera, 1999; Sattler, 2011).

O termo “automação” em imuno-histoquímica deve ser entendido como o conjunto de processos envolvidos na preparação da coloração, incluindo todos os procedimentos sem necessidade de intervenção manual (Riera, 1999).

O uso de automação no laboratório tira o foco das reações que ocorrem durante a técnica, o que pode levar a crer que os técnicos estão somente apertando botões, isto pode ser considerado uma consequência negativa da automação. No

entanto o que ocorre efetivamente com a automação é a redução no manuseio das lâminas e conseqüentemente a redução de erros e repetições, além de o equipamento permitir mais tempo livre ao técnico para que produza em outras áreas (Sattler, 2011; Rasmussen, 2013).

A característica da técnica de IHQ que consiste em ciclos de aplicação de reagentes, incubações e lavagens com tampões favorece a automatização do processo. Existe a preocupação dos fabricantes para que a automação seja cada vez mais eficiente e também que o *software* tenha uma interface mais intuitiva para o usuário (Riera, 1999; Boenisch *et al.*, 2002; Sattler, 2011).

O ponto principal para a garantia de uma coloração de alta qualidade está na adequada aplicação de reagentes, tempo correto de incubação, qualidade dos reagentes e protocolos otimizados especificamente para o equipamento. O preparo do operador para utilizar o equipamento também é crucial (Rasmussen, 2013).

O mercado tem proporcionado diferentes opções para o laboratório realizar sua técnica de IHQ com automação, existem quatro principais tipos de sistema em uso (Myers, 2008; Sattler, 2011; Rasmussen, 2013;):

a) Tecnologia de lacuna capilar: utiliza o espaço estreito entre duas superfícies dispostas verticalmente, para puxar e manter os fluídos nesse espaço capilar.

b) Tecnologia de lacuna capilar dinâmica: utiliza o espaço capilar, porém a lâmina que cobre a reação movimenta-se garantindo a fluidez dos reagentes e uma coloração uniforme. Esta é a tecnologia do equipamento Omnis da Dako.

c) Tecnologia de sobreposição de líquido: uma camada de fluído inerte é depositada sobre a lâmina na posição horizontal, tal como no sistema manual.

Todos os reagentes são sobrepostos e misturados. Possibilita trabalhar em temperaturas elevadas sem a evaporação e o dano de secar a lâmina.

d) Sistema de automação aberto ou fechado

No sistema aberto é possível utilizar qualquer reagente como tampões de recuperação antigênica, anticorpo e sistema de detecção. Um sistema bastante flexível mais utilizado em pesquisa.

No sistema fechado o kit de detecção deve ser o indicado pelo fabricante, os demais reagentes são concentrados ou prontos para uso, os passos do protocolo como a recuperação antigênica apresentam restrições. São utilizados anticorpos prontos para uso, mas também é permitida a padronização de anticorpos concentrados. O uso deste sistema permite atingir elevado grau de padronização.

Cada sistema de automação disponível no mercado tem seus pontos fortes e fracos que devem ser considerados no momento em que se faz a opção por automatizar a IHQ. As questões que devem ser primariamente observadas são a obtenção de resultados consistentes na coloração, a relação custo-benefício bem como a posterior gestão dos custos (Myers, 2008).

1.6.1 Plataforma de Automação Benchmark XT-Ventana®

O equipamento possibilita a automação total das técnicas de Imuno-histoquímica, Hibridização *In Situ* e Imunofluorescência (Fig. 18) e é composto basicamente por três módulos: o módulo de coloração, o módulo de fluídos volumosos e o módulo de resíduos (Ventana Medical systems, Inc. Benchmark XT, 2014).



Fig.18 Benchmark XT- Ventana

Fonte: <http://www.roche-diagnostics.co.in/Products/Pages/BenchmarkXT.aspx>

❖ Módulo de coloração

Local onde é possível posicionar até 30 lâminas na bandeja de incubação por corrida e 25 reagentes no carrossel como anticorpos, componentes do sistema de detecção, contra-coloração e pós-contracoloração;

Hematoxilin II- (Ref. 790-2208, Ventana®): corante nuclear hematoxilina de Mayer modificado (Ventana Medical systems, Inc. Hematoxilin II, 2014).

Bluing (ref. 760-2037, Ventana®): solução aquosa do tampão carbonato de lítio, utilizada para azular a amostra (Ventana Medical systems, Inc. Bluing Reagent, 2014). Os reagentes posicionados no módulo de coloração estão acondicionados em embalagens denominadas Prepkits (Fig. 19).



Fig. 19 Rack com prekits contendo os anticorpos

Fonte: Elaborado pelo autor

O kit de detecção utilizado neste estudo foi o ultraView Universal DAB Detection Kit- (Ref. 760-500, Ventana®). Trata-se de um método indireto, livre de biotina que detecta anticorpos primários de camundongo IgG e IgM e anticorpos primários de coelho, destinado a visualização da ligação antígeno-anticorpo através do depósito de um precipitado marrom (Fig. 20) (Ventana Medical systems, Inc. ultraView Universal Dab Detection Kit, 2014).

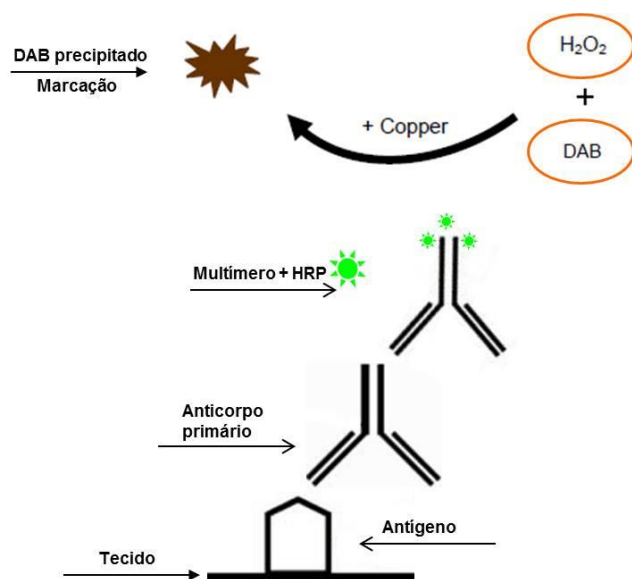


Fig.20 ultraView Universal DAB Detection Kit

Fonte: Modificado de <http://www.ventana.com/product/catalog>

Este kit permite fazer 250 testes imuno-histoquímicos e é composto de:

- ❖ *ultraView Universal DAB Inhibitor* (solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%);
- ❖ *ultraView Universal HRP Multimer* (contém anticorpos marcados com HRP anti-camundongo IgG, anti- camundongo IgM e anti-coelho em um tampão);
- ❖ *ultraView Universal DAB Chromogen* (contém 0,2% de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro);
- ❖ *ultraView Universal DAB H2O2* (contém 0,04% de peróxido de hidrogênio em solução tampão);
- ❖ *ultraView Universal Copper* (contém (5g/L) de sulfato de cobre em um tampão de acetato). A utilização deste kit resulta em um produto de cor marrom precipitado nos locais onde o anticorpo primário foi ligado ao antígeno.

O kit de amplificação utilizado em conjunto com o kit de detecção *ultraView Universal DAB* (***Amplification Kit*** - Ref. 760-080, Ventana®), aumenta a intensidade do sinal da marcação. Para isto utiliza-se o anticorpo de coelho anti-camundongo IgG de cadeias pesada e leve e o anticorpo de camundongo anti-coelho IgG de cadeia pesada que se ligam ao anticorpo primário, aumentando o número de anticorpos ligados no local do antígeno (Fig. 21) (Ventana Medical systems, Inc. Amplification kit, 2014).

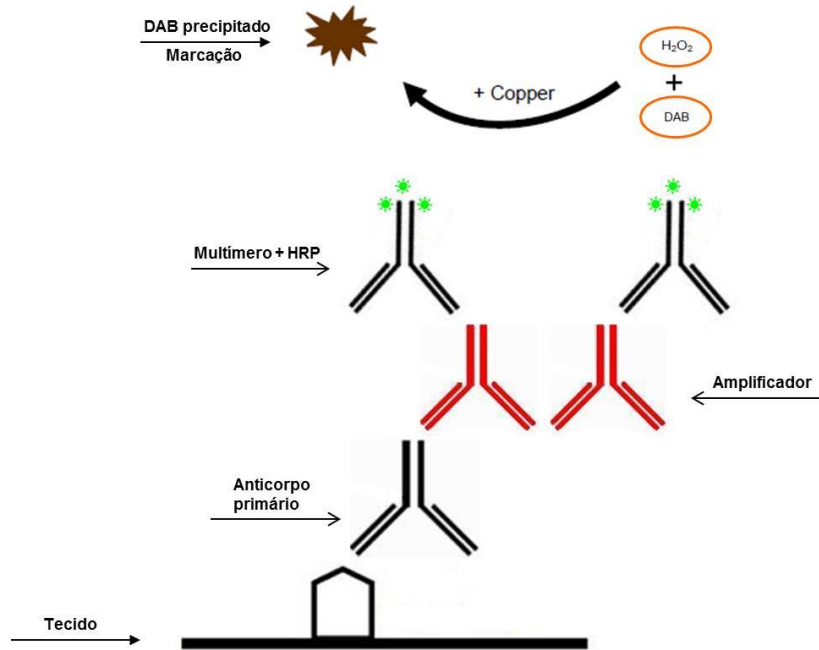


Fig.21 Amplificador para o kit ultraView Universal DAB

Fonte: Modificado de <http://www.ventana.com/product/catalog>

❖ Subconjunto de fluídos volumosos

- **EZ Prep, 10x-** (Ref. 950-102, Ventana[®]): solução de desparafinização concentrada, patenteada pela Ventana, livre de álcool e xilol, apresentando pH de 7,0 (Ventana Medical systems, Inc. EZ Prep, 2014).
- **Liquid Coverslip (LCS)-** (Ref. 650-010, Ventana[®]): óleo de baixa densidade pronto para uso, que forma a “câmara de reação” como barreira que impede evaporação dos reagentes e ressecamento da amostra durante as reações de IHQ e de Hibridização *In Situ* (ISH) (Ventana Medical Systems Inc. LCS, 2014).
- **Sodium Chloride Sodium Citrate buffer (SSC), 10x-** (Ref.950-110, Ventana[®]): tampão de alta estringência concentrado utilizado para lavar e enxaguar as lâminas entre os passos da coloração e fornecer um ambiente aquoso estável nas reações de ISH, apresenta pH 7,0 (Ventana Medical systems, Inc. SSC, 2014).

- **Reaction Buffer Concentrate 10x**- (Ref. 950-300, Ventana®): solução tampão concentrada a base de Tris (pH 7,6 ± 0,2) para enxague das lâminas entre os passos da reação e fornecer um ambiente aquoso estável nas reações de IHQ e ISH (Ventana Medical systems, Inc. Reaction Buffer, 2014).
- **Cell conditioning 1 (CC1)**- (Ref. 950-124, Ventana®): tampão a base de Tris, pronto para uso, apresentando pH levemente básico, utilizado para recuperação antigênica na técnica de IHQ (Ventana Medical systems, Inc. CC1, 2014).
- **Cell conditioning 2 (CC2)**- (Ref. 950-123, Ventana®): tampão citrato, pronto para uso apresentando pH levemente ácido, utilizado para recuperação antigênica na técnica de IHQ e ISH (Ventana Medical systems, Inc. CC2, 2014).
- **Silver Wash II**- (Ref. 780-003, Ventana®): solução utilizada na lavagem da lâmina após cada incubação para remover o material excedente nas reações de ISH e fornecer um ambiente aquoso estável em reações (Ventana Medical systems, Inc. Silver Wash, 2014).

Criação de protocolo

O operador deve criar o protocolo que deseja executar, imprimir a etiqueta, colar a etiqueta na lâmina com os cortes, carregar os fluídos volumosos, carregar os reagentes como anticorpos, kit de detecção, hematoxilina e a solução *Bluing*.

Para executar o protocolo é necessário iniciar o *software* e a seguir colocar o equipamento no modo executar. A seguir estão ilustrados os passos para definir pontos importantes no protocolo (Fig. 22 a 26).

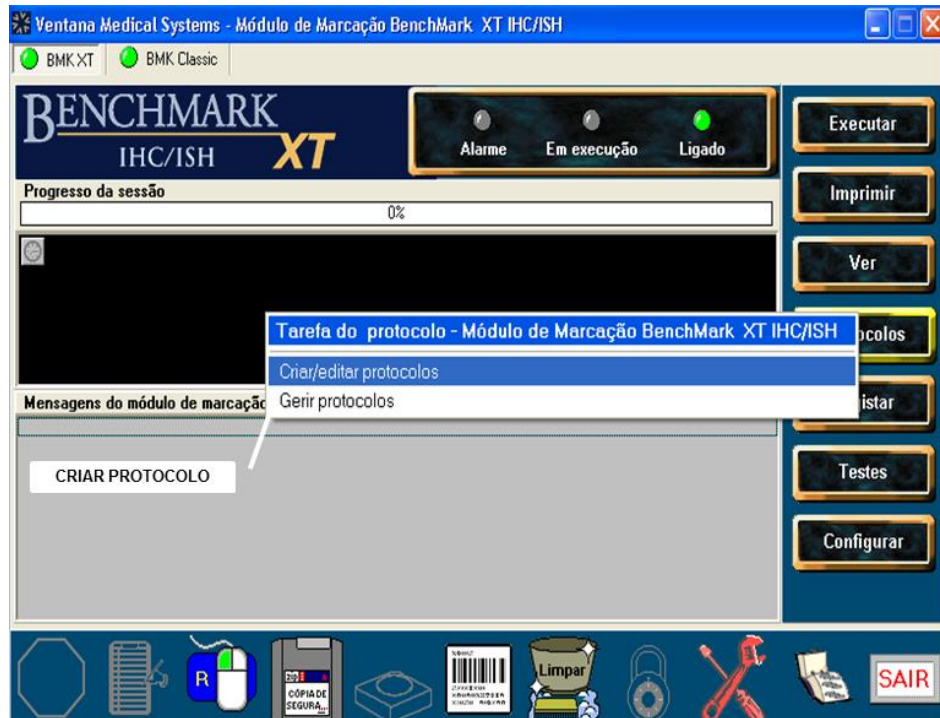


Fig. 22 Tela de criação de protocolos

Fonte: Elaborado pelo autor

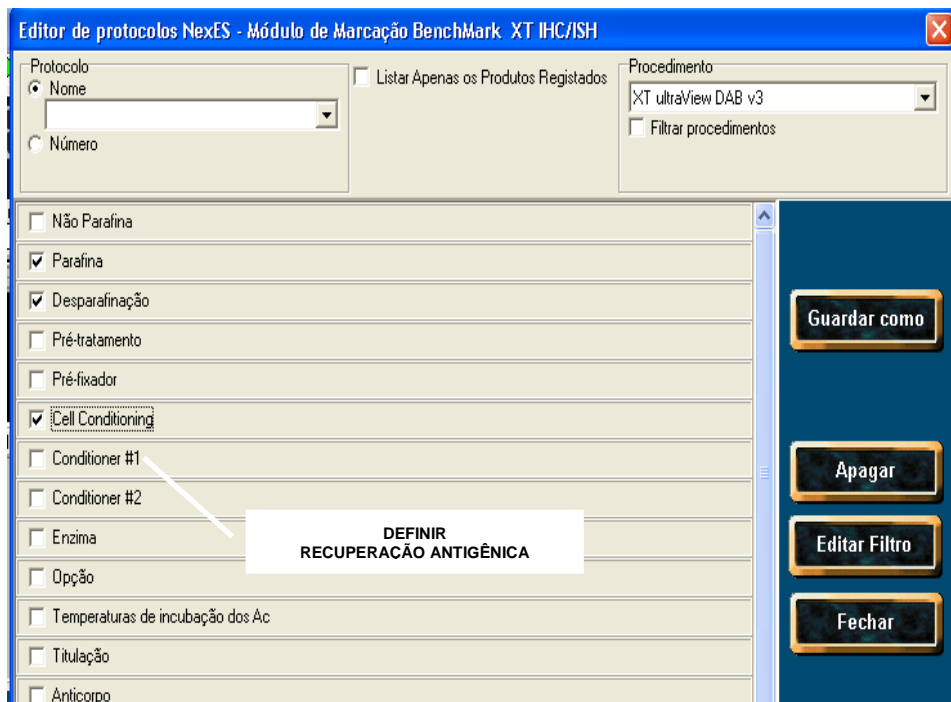


Fig. 23 Tela de escolha do tipo de recuperação antigênica

Fonte: Elaborado pelo autor

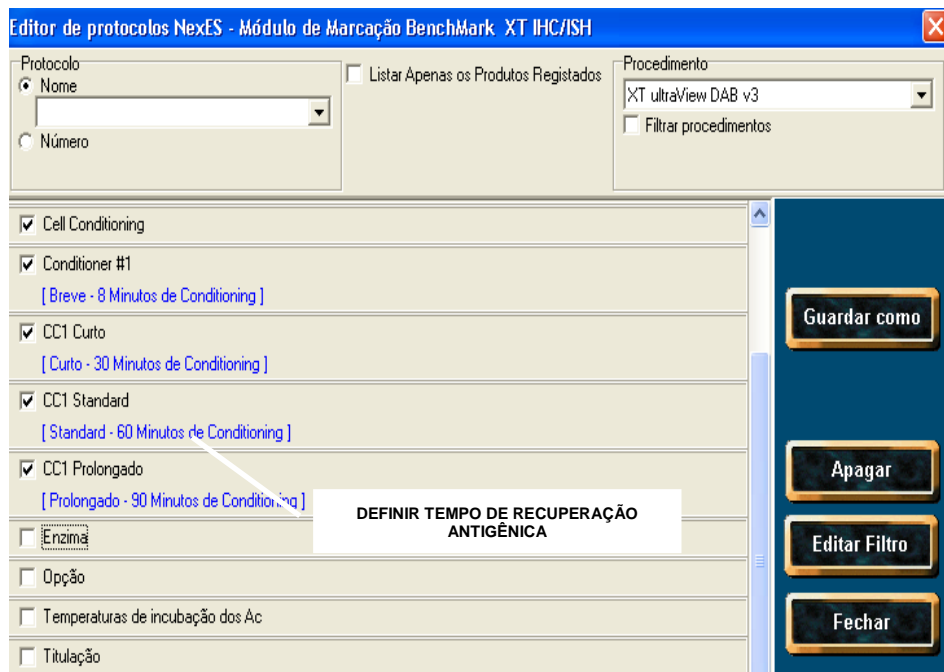


Fig. 24 Tela de escolha do tempo de recuperação antigênica

Fonte: Elaborado pelo autor

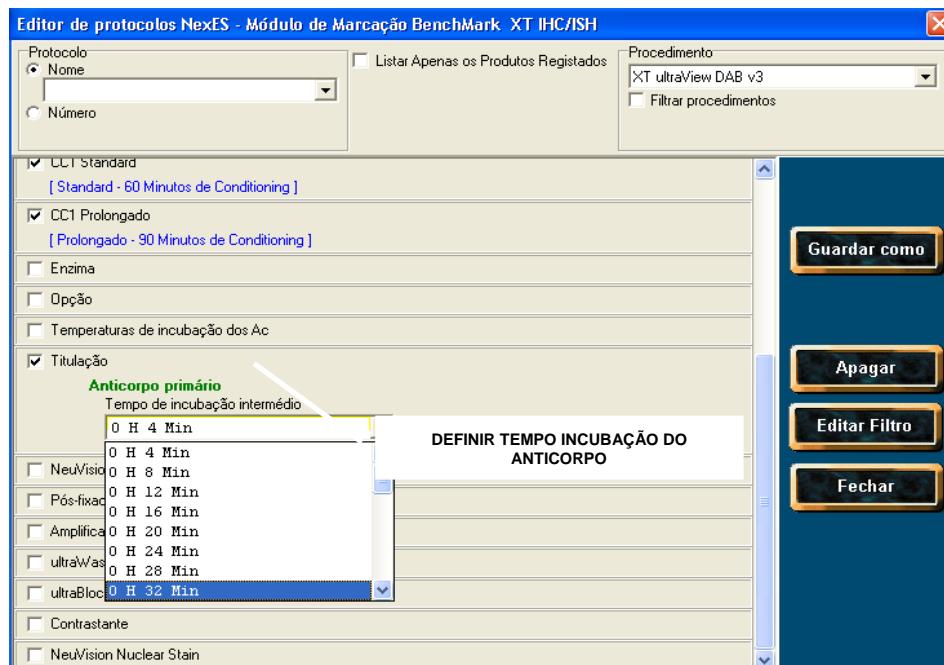


Fig. 25 Escolha do tempo de incubação do anticorpo

Fonte: Elaborado pelo autor

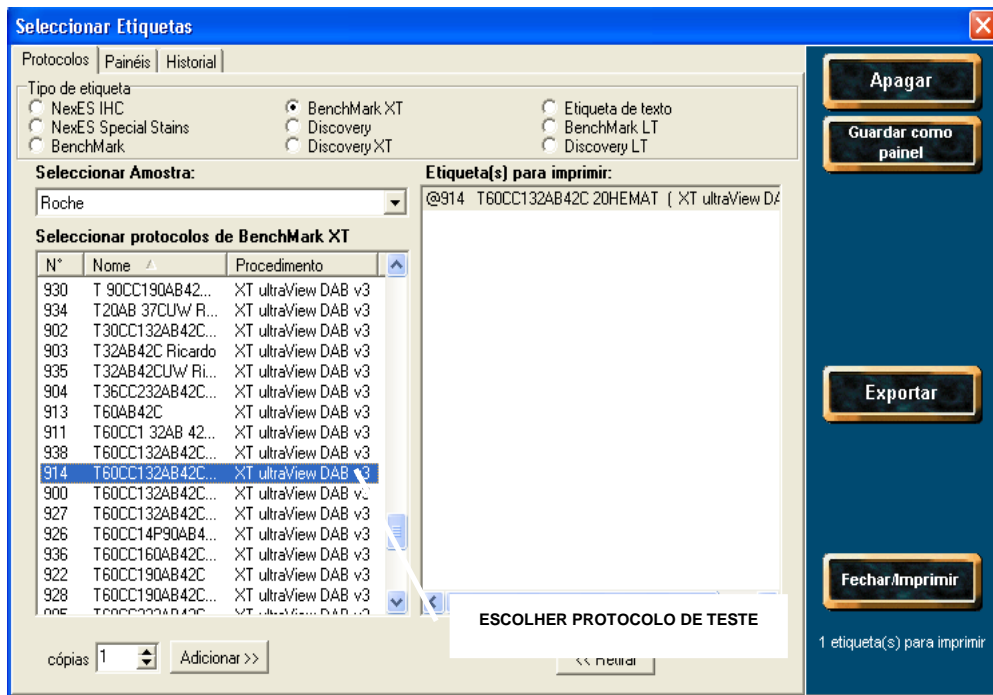


Fig. 26 Tela para impressão da etiqueta do protocolo de teste

Fonte: Elaborado pelo autor

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Padronizar os protocolos dos anticorpos primários concentrados, definindo a recuperação antigênica, a titulação e o tempo de incubação dos anticorpos para utilização em automação no equipamento Benchmark XT da Ventana® (Anexo I, pg. 97, lista de anticorpos para padronização).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

❖ Testar o uso de anticorpos primários concentrados no sistema de automação aberto da Ventana® utilizando marcadores comercializados pelas empresas Abcam, ARP (American Research Products, Inc.), Calbiochem, Dako, Diagnostic BioSystems (DBS), Novocastra (Leica Biosystems), Santa Cruz Biotechnology, Quidel, Spring Bioscience, Zymed.

❖ Desenvolver um manual que contenha além do protocolo, imagens com a marcação esperada para cada anticorpo padronizado para uso em automação.

3 JUSTIFICATIVA

Inserir uma plataforma de automação é uma alternativa para minimizar as variáveis analíticas associadas à técnica IHQ. A plataforma de Automação Benchmark XT-Ventana[®] que permite o uso de anticorpos que o laboratório já possui, o que se justifica pela inviabilidade de um único fornecedor oferecer todos os anticorpos prontos para uso.

No entanto, para utilizar anticorpos que não são prontos para uso, é necessária uma etapa de padronização do protocolo de cada anticorpo para viabilizar o uso de outros anticorpos na plataforma de automação escolhida.

Atualmente não existe um manual de padronização de protocolos de anticorpos concentrados para uso em automação neste equipamento. Tampouco literatura a cerca do processo de transição da técnica Imuno-histoquímica manual para o uso de automação. Este trabalho destina-se, portanto a consultas futuras sobre o processo de padronização de anticorpos para uso em automação.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Standardization of immunohistochemical marker protocols for use in automation platform

Emily Ferreira Salles Pilar¹, Claudio Galleano Zettler²

¹UFCSA Post-Graduation Doctorate Pathology Program Student; ²UFCSA Post-Graduation Doctorate Pathology Program Professor

Abstract

The demand for immunohistochemical examination in Anatomic Pathology laboratories grows exponentially. With the introduction of biopharmaceuticals directed to target molecules, their reports shall provide accurate results, supporting the tendency in laboratories of introducing automation in immunohistochemistry, which significantly decreases the test variability. This study was developed in the Porto Alegre Santa Casa Hospital Complex Anatomic Pathology Laboratory, and its goal was standardizing 120 concentrate primary antibodies from various manufacturers in the Benchmark XT automation platform (Ventana Medical Systems/Roche Tissue Diagnostics, Tucson, AZ). The 41 samples containing the focus antigens included in the study were the following: 1) Surgical pieces fixed with 10% buffered formalin; 2) positive tissue in manual immunohistochemistry reaction; 3) tissue presenting representativeness of the studied lesion, structure, cell type. 120 markers were successfully standardized. The most frequently used protocol was the antigen retrieval with cell conditioning 1 for 60 minutes, and primary antibody incubation for 32 minutes at 42°C. The most common dilution was 1:100. We hope the developed manual serves as a reference for future works and for laboratories with an interest in automating their immunohistochemistry routine.

Keywords: Antibodies, Automation, Immunohistochemistry, Standardization.

INTRODUCTION

The histomorphological classification criterion, in which neoplasia is identified by the tissue or cell that is proliferating, is the most widely used criterion in anatomic pathology.¹ The preparation of haematoxylin and eosin-stained (HE) histological cuts for observation under the light microscope is the most widely used procedure for tissue studies.^{1,2,3} When there is the need for identification of other specific tissue elements it is possible to use histochemical and immunohistochemical techniques.^{4,5,6}

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

When the conventional morphological study (HE) does not allow for diagnostic conclusion, specific techniques, such as the immunohistochemical (IHC) play an essential role. The IHC is a group of procedures that uses antibodies as specific reagents for detecting the presence of antigens in tissues, being an important tool for identifying and locating various antigens.¹

Main recommendations for the immunohistochemical examination:

1) Histogenetic diagnosis of morphologically undifferentiated neoplasias: Aiding in the identification of a biochemical signature of poorly differentiated neoplastic (anaplastic) cells.^{3,7}

2) Neoplasia subtyping: Determining the immunophenotypic profile in the diagnosis and classification of lymphomas, for instance, in this context the diseases may derive from the same cell types in different maturation stages.^{3,8,9}

3) Characterizing the origin of carcinomas: Determining the primary site that originated the

metastatic disease, today's clinical practice combines immunohistochemical results and clinical information.^{7,10,11}

4) Characterizing neoplastic cell secretion products: It is possible to characterize endocrine cells using non-hormonal markers, particularly in the identification of neuroendocrine cells and their tumors.^{4,12,13}

5) Differentiating the benign versus the malignant nature of certain cell proliferations: Reactive proliferations give origin to tumors and may mimic neoplasias. An example of neoplastic alteration in the normal cell composition is the development of lymphomas.⁷

6) Prognostic assessment of neoplasias: The IHC is essential to the therapeutic approach of mammary carcinoma, for example, a complex disease with high clinical, morphological and biological heterogeneity, which may present different prognosis and therapeutic responses.^{3,14,15,16,17,18}

7) Identifying infectious agents: Histochemical staining is usually necessary for characterizing microorganisms in tissues. However, the IHC is a more specific technique for characterizing the etiological agent.¹⁹

IMPORTANCE OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN TUMORS THERAPY

Currently the correlation of biomarkers through IHC makes up many protocols of multicenter clinical trials, and may be part of a patient's inclusion criterion in a protocol, to detect the therapeutic target, monitor therapeutic responses, or indicate

the prognostic meaning.¹⁴The antigen persistence demonstration of a certain cell lineage through IHC enhances the efficiency of the therapy which, in turn, is better oriented to a particular lineage of neoplastic cells.³ Therapeutic monoclonal antibodies meaningfully established, above all, in cancer treatment.^{20,21} Estimating the molecule CD 20 expression in cell B lymphomas is fundamental for therapy with Rituximab, a humanized monoclonal anti-CD20 antibody used in non-Hodgkin lymphomas.^{22,23} The humanized monoclonal antibody Trastuzumab anti-HER/neu presents inhibiting activity against tumor cells that over-express the HER2 protein. Tamoxifen is the gold standard treatment for adjuvant endocrine therapy in patients with positive RE, substantially extending life expectancy, reducing tumor reoccurrence and mortality.^{24,25,26}

USE OF ANTIBODIES IN IMMUNOHISTOCHEMISTRY: The application of fluorescent antibodies for studying molecules in cells and tissues was introduced by Albert H. Coons and collaborators in 1942.^{27,28} The introduction of enzymes such as peroxidase enabled advances in the technique.^{7,28,29} The amount of antibodies available for use in the tissue fixed in formalin and included in paraffin has expanded exponentially. The antibodies used in IHC may be monoclonal, those that result in hybridoma, the fusion of immunized cells with myeloma cells; or polyclonal, a mix of molecules with different specificities that bind to the different epitopes of the immunogen.^{1,2,7,28,30}

IMMUNOHISTOCHEMISTRY TECHNIQUE

The IHC plates go through the following stages: **1) Plate preparation:** Histological cut and placement in adequate plates; **2) Deparaffinization** in a 60°C (140°F) heater and, afterwards, with xylol; **3) Antigen retrieval:** Process through which the cross-bindings between the tissue proteins and formalin are eliminated, exposing the antigen. Among the main methods are: enzymatic digestion and heat induced antigen retrieval with the use of different buffering solutions; **4) Endogenous peroxidase blocking:** Performed with the saturation of endogenous peroxidase with its substrate (hydrogen peroxide); **5) Incubation with the primary antibody;** **6) Detection and revealing with chromogen:** Visualization of the antigen-antibody binding location, through immunoenzymatic techniques and reaction with chromogenic substrate - Diaminobezidine (DAB) - obtaining a brown precipitation as the final product of the reaction. **8) Differentiation:** Made with an aqueous ammonia hydroxide solution, 2%; **9) Dehydration:** With anhydrous alcohol; **10) Assembly:** With means of assembly and glass slide.^{3,7,31,32,33}

FACTORS THAT INFLUENCE THE IMMUNOHISTOCHEMICAL TEST

The factors that may influence IHC start during surgery and may occur until the results are

interpreted by the pathologist that guides the conduct of the oncologist.³⁴

Pre-analytic Phase

Fixation: The specimen should be fixed as soon as possible in 10% buffered formalin.^{7,34,35,36,37} Late or insufficient fixation affects staining due to the loss of antigenicity or to antigen diffusion.^{7,38} The fixation duration time is critical, the recommended being a minimum of 8 hours, not exceeding 24 hours.^{3,35}

Tissue processing: In this stage there are marked differences among laboratories, and the absence of standardization may be reflected in the IHC result. Better results are obtained during impregnation with paraffin at a 45 to 50°C (113 to 122°F) melting point. Solvents and detergents may also cause alteration in proteins through solubilization or fluidization of the lipid membrane.^{39,40}

Analytic Phase

Employed technique: The accuracy in the final diagnosis reflects the efficiency of all sequential steps in the technique. The lack of qualified personnel combined with an increase of demand may corroborate to the need to acquire automation in IHC.³⁶ The examination may be performed manually, with the aid of semi-automation or full automation.^{34,41,42} Some automation options available are: Ventana Benchmark Ultra (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona), Leica Bond III (Leica Biosystems, Buffalo Grove, Illinois) and Dako Omnis (Dako North America, Carpinteria, California).³⁶ When choosing the automation system, ease of use, slide capacity, reaction time, amount of reagents needed, and flexibility should be considered.³⁶

Antigen retrieval: Not all antibodies need heat-induced or enzymatic retrieval.^{3,35} pH solutions between 8.0 and 9.0 produce yield good results for most antigens.³³ Epitope retrieval exclusively through enzymatic digestion applies to few antibodies.³⁷ It is common to find a mix of insufficiently fixed tissues and over-fixed tissues in laboratories, which may incur in antigen retrieval inefficiency and inconsistent results in the IHC.³⁷

Antibody selection Some questions have to be answered in the selection process: Why do we need this antibody? What is the clinical application of this antibody? Does this antibody have a new target? Is it replacing another already existing antibody? What is its sensibility and specificity? Is there more than one clone for this marker?^{36,43}

Antibody optimization: For testing an antibody, the specifications of the manufacturer must be read: recommended control, antigen retrieval, dilution, and time of incubation.^{36,37} Antibody origin (mouse or rabbit); antigen location, antigen classification, if its reagent for the analysis, the research, or the *in*

vitro diagnosis (IVD). The latter is recommended for use in the tissue of patients.⁴¹

Internal validation of the antibody: Should occur before the use of the antibody in an examination. Some of the recommendations are testing at least 10 positive and 10 negative tissues, if the marker is not a predictive marker; and if it is a predictive marker, 20 positive and 20 negative tissues are necessary.³⁶ A new test should have a high level of concordance (90%) with the previously validated test.^{36,37} Use fixed and processed control in validation in equal form to the patient's tissue.³⁶ Revalidate the test every time there are changes to the procedure.³⁷ Revalidate new batches of the antibody, testing three samples: one with a high level of antigen expression, one with intermediate to low level of expression, and one without the focus antigen.³⁷ Document the validation.³⁶

Selection detection: For the antigen-antibody binding to be visible, a complex marked with an enzyme is necessary for the final reactive stain.⁴¹ In the indirect immunohistochemical method, a second antibody marked for recognizing the primary antibody bound to the antigen is used.⁴⁴ The most commonly used combination is the horseradish peroxidase (HRP) with the 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) chromogen.⁷

Chromogen selection: Some of the chromogens used are the 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), Fast Red, 3-amino-9-ethyl-carbazol (AEC), and the blue chromogen.⁴⁴

Counterstaining: Haematoxylin is the most commonly used counterstain.⁴⁵

Technical qualification: A well-trained team, experienced and available for ongoing learning is essential to aid in diagnosis and treatment of patients.^{3,42,46}

Post-analytic Phase

Result interpretation: Among the factors that affect IHC interpretation are the analysis of small biopsies vs. large specimens, the amount of antigen in the tissue, antibody sensitivity, staining sensitivity of external and internal controls.

Immunohistochemical report preparation: The antibody, result, clone, antigen location, antigen expression type, specimen and tissue anatomical location, and paraffin block number should be cited.^{36,37}

Pathologist expertise: The pathologist is responsible for confirming whether the IHC positive or negative results are accurate; they should also make a daily assessment of stain quality.⁴¹

IMMUNOHISTOCHEMISTRY QUALITY CONTROL

Factors such as the use of various antibodies (different clones), the absence of uniformity in the detection systems, and various methods of antigen

retrieval may contribute to intra- and inter-laboratorial differences in IHC.⁴⁷

The main aspects for ensuring quality in IHC are correct indication of the examination, selection of antibodies, protocol, technique standardization, and the interpretation by the pathologist.³ The non-delegable duty of the pathologist as to the interpretation lies especially in identifying which cells show reactivity to the antigen, the morphological changes in reactive cells, as well as the antigen intra-cellular distribution, in comparison to the patterns already reported in the literature for each molecule.³

Among the major external assessment programs of IHC quality are those offered by CAP (College of American Pathologists) and ASCO (American Society of Clinical Oncology), in the United States, and UK-NEQUAS (United Kingdom National Quality Assessment Service) and NordicQC (Nordic Quality Control), in the United Kingdom.^{35,36} In the CAP proficiency test the participating laboratory must develop the IHC slides sent by CAP and submit the results found to experts in the subject, in order to receive certification.^{36,48}

The interpretation and validation of the results of the IHC and of the findings require verifying the marker reactivity patterns in a reference tissue (tissues used for control are those that have a known expression).^{3,41,49}

IMMUNOHISTOCHEMISTRY AUTOMATION

As the number of slides in IHC increases, the reproducibility and quality may decrease. Automation should enable a significant increase in the laboratory productivity without loss in quality.^{50,51} The market has different automation options, among the main systems are: 1) Capillary gap technology. 2) The liquid-overlay technology. 3) Open- or closed-automation. In the open system it is possible to use any reagent as antigen retrieval buffers, antibody and detection system. A very flexible system, mostly used in research. In the closed system there is no such flexibility.^{52,53}

Ventana Benchmark XT enables full automation of immunohistochemical techniques, *in situ* hybridization and immunofluorescence, and has a single drawer for 30 slides.⁵⁴ The operator creates the protocol they want, prints and attaches the label to the slide with the cut. It is necessary to place the voluminous fluids, antibody prep kits, detection kits, haematoxylin, and bluing in the equipment. We used the ultraView Universal DAB detection kit, an indirect method that detects primary antibodies of mouse IgG/IgM and rabbits, intended for viewing the antigen-antibody binding.⁵⁵

The following are voluminous fluids of the system:

EZ Prep: Concentrate deparaffinization solution.⁵⁶

Liquid Coverslip (LCS): An oil that forms the "reaction chamber", preventing the reagents from evaporating and the sample from drying out.⁵⁷

Sodium Chloride Sodium Citrate Buffer (SSC): High stringency buffer for washing and rinsing the slides and providing a stable aqueous environment in *in situ* hybridization (ISH) reactions.⁵⁸

Reaction Buffer: A Tris-based buffer solution for rinsing the slides during reaction and providing a stable aqueous environment in IHC and ISH reactions.⁵⁹

Cell Conditioning 1 (CC1): A high pH Tris-based buffer for antigen retrieval in the IHC technique.⁶⁰

Cell Conditioning 2 (CC2): A low pH citrate buffer for antigen retrieval in the IHC and ISH techniques.⁶¹

Silver Wash II: A solution used for rinsing the slide, removing surplus material in ISC reactions, and for providing a stable aqueous environment in reactions.⁶²

The system has two 20-liter reservoirs for chemical waste disposal. After each work session the equipment provides 30 slides, which must be washed with mild soap as to remove the LCS. Dehydration is done with anhydrous alcohol and assembly through usual assembly means and glass slide.

GENERAL OBJECTIVE: Standardizing the protocols of 120 concentrate immunohistochemical markers from various manufacturers, in order to use them for automation in the Benchmark XT equipment.

SPECIFIC OBJECTIVES: 1) Defining the antigen retrieval, titration and incubation time for the concentrate primary antibody. 2) Testing the concentrate primary antibodies marketed by the following companies: Abcam, ARP, Calbiochem, Dako, Diagnostic BioSystems (DBS), Novocastra, Santa Cruz Biotechnology, Quidel, Spring Bioscience, and Zymed, in the Ventana automation system. 3) Developing a manual containing the protocols and images of the standardization with the expected marking for each antibody.

MATERIAL AND METHODS

Inclusion criteria: For testing 120 antibodies in automation, 41 tissue samples containing the focus antigen were selected at the Porto Alegre Santa Casa Hospital Complex Anatomic Pathology Laboratory. Selected tissue samples were: Surgical pieces fixed with 10% buffered formalin; positive tissue in manual IHC; tissue with representativeness of the studied lesion, structure or cell type. A histological cut of 5 μm thick Star Frost glass slides was performed for testing each antibody.

Protocol definition: The manufacturer indication was verified against antigen retrieval and dilution after reading through the information inserts of the

antibodies. As for the indication for the antigen retrieval, the antibodies were divided into three groups: 1) **Heat-induced antigen retrieval necessary;** 2) **Antigen retrieval through enzymatic digestion necessary** (Protease I)⁶³; and 3) **No antigen retrieval necessary** (Fig. 1).

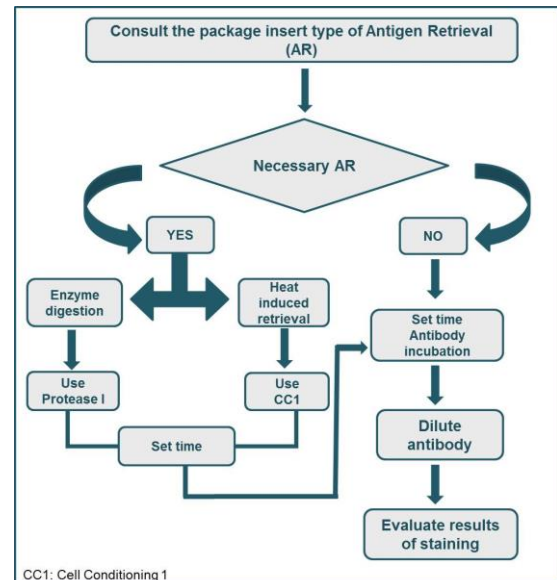


Fig.1 The Protocol definition for consulting the package insert

Antibody titer: The first dilution was done based on the indication of each antibody manufacturer and was done with Antibody Diluent (Ventana).

Validation through standardization: After each session the slides were individually against the marking obtained by the pathologist, according to the criteria presented in Table 1.⁶⁴

Table 1. Criteria evaluation of the protocols tested		
1- Specific reactivity	2- Technical quality	3- Background
Reactivity to antigen	Assessment of histological cut counterstain Tissue drop Presence of artifacts	Evaluation Background staining
Grade	Grade	Grade
0- absent	0- unsatisfactory	0- absent
1- weak	1- regular	1- little
2- satisfactory	2- satisfactory	2- marked

Modified from: ALVES, VAF *et al.* J Bras Patol Med Lab.2004

After the assessment of each slide when needed, the protocol was changed according to the flowchart in Figure 2.

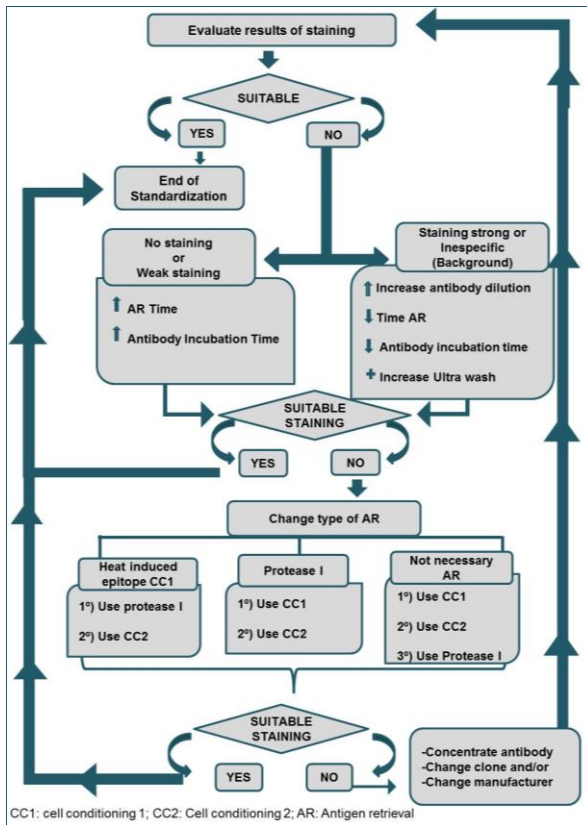


Fig. 2 Result evaluation algorithm Immunohistochemistry marking

RESULTS

120 antibodies were standardized (Table 3). The most frequently used protocol was the antigen retrieval with *Cell Conditioning 1* for 60 minutes, and primary antibody incubation for 32 minutes at 42°C (107.6°F) (Table 2).

Table 2 – Antigen Retrieval Type

Antigen Retrieval	Antibody	%
Heat induced epitope retrieval		
Cell Conditioning 1	102	85,00
Cell Conditioning 2	1	0,83
Antigen Retrieval by enzymatic digestion	6	5,00
Antigen Retrieval Not necessary	11	9,17

As for the incubation time with primary antibodies, the results are as following: 100 antibodies for 32 minutes (83.3%), 5 antibodies for 60 minutes, and 15 antibodies incubated for 90 minutes. The incubation temperature in all tests was 42°C (107.6°F).

Dilutions (Fig. 3) varied from 1:10 to 1:4000. Most antibodies (69%) concentrated in the dilution range of 1:10 to 1:300.

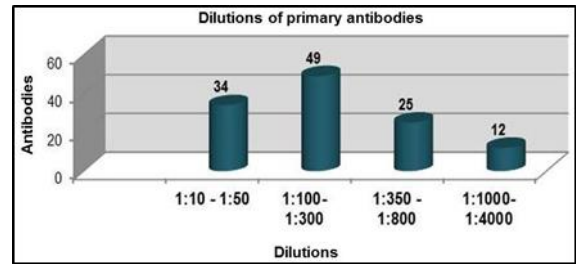


Fig.3 Dilutions of primary antibodies in automation

The counterstaining time with haemotoxylin was defined by the antigen location. Nuclear antigens received 8 minutes of haemotoxylin and the remaining ones, 12 minutes. With the intention of not damaging the DAB chromogen staining.

An analysis was made as to the expiration dates of the antibodies and dilutions obtained. At the time of the study 30.2% of the antibodies were expired; however, presenting a satisfactory marking.

The statistical Spearman's correlation test was applied with the goal of verifying whether the dilution variables and the expiration date were correlated, verifying whether the use of expired antibodies had any influence in the dilutions obtained. The significance level was fixed at $p < 0,05$. The result was $r = 0,090$ and a value of $p = 0,332$ statistically meaningless, showing that there was no correlation between the two variables.

This study gave origin to a manual containing the protocols, marker descriptions, the tissue in which the antibody was standardized, and is illustrated with pictures from the standardization result.

DISCUSSION

Automation decreases the variability in the immunohistochemical examination. Many factors make it impossible to establish a universal standard protocol for IHC, however, it is the role of each laboratory choosing and validating the optimal combination of reagents and protocols for each marker.^{35,38}

The in-house antibody standardization that will be used in automation is part of the transition to a automated IHC, when the use of concentrate antibodies is allowed. In this case, the manufacturer's recommendations are a good starting point.^{35,38}

The data in this study reveal that most concentrate antibodies benefited from the use of heat induced antigen retrieval in CC1. The antibody dilutions were, in general, lower when compared to the dilutions used in the manual technique, with 69% of diluted antibodies in the range of 1:10-1:300. This result may be due to the antibody incubation time which, in the manual technique, is at least 14 hours long (2-8°C, 35.6-46.4°F), and in the equipment, at most 90 minutes long. All antibodies performed well, what indicated the viability of use of the concentrate antibodies in stock in the laboratory when the automation was implemented. In the study, the antibodies from Dako and Novocastra manufacturers were used in 89% of the tests. The Spearman test for the antibody expiration date and

dilution indicates that there is no correlation between the two variables. The satisfactory marking of all antibodies, including the expired percentage (30.2%), corroborates to the absence of correlation in this sample.

FINAL CONSIDERATIONS

The concentrate antibody standardization must be carefully performed, so that when protocol is established it is really the best. The standardization process in large centers, which have a great number of antibodies, may present itself as a hard endeavor. In addition to that, this standardization has high costs, as the laboratory will be paying a certain amount for the slide and to the employees executing this stage.⁶⁵

The characteristic of an equipment to process and release each prepared slide is superior to that of a system that releases all slides at the same time as tested in this study. This system favors time savings and the prioritization of urgent examinations.

However the use of automation will always speed up the immunohistochemistry technique. Automation allows more team members to share the work. The equipment monitors their processes, having alarms for inadequate events. Full reagent barcode traceability facilitates input stock and expiration date management.⁶⁶

The data presented here are part of the thesis called "**Standardization of immunohistochemical marker protocols for use in automation platform.**" The research resulted in the creation of a database about the automation process for at least 120 antibodies used in the laboratory (Table 3). The benefits of automation in IHC seem to meet the requirements for greater reproducibility, quality, and standardization, in parallel with the increase in demand. Automation was applied in many files of the medical sciences, setting itself in the pathology laboratories for good.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Claudio Galleano Zettler for the support during the execution of the work and Dr. Marínez Bizarro Barra from Porto Alegre Santa Casa de Misericórdia Hospital Complex Pathology Laboratory for evaluating the slides.

Table 3 Protocols for Ventana Benchmark XT- Automation

Antibodies	Clone	AR	Antibody Incubation	Titer
Adrenocorticotropin	02A3	No	32 min	1:1000
ALK	ALK1	60 min CC1	32 min	1:250
Alpha-1- Fetoprotein	Policlonal	No	32 min	1:50
Annexin 1	Policlonal	90 min CC1	90 min	1:50
Bcl 2 Oncoprotein	124	90 min CC1	90 min	1:25*
Bcl 6	PG-B6p	90 min CC1	90 min	1:50*
β -Catenin	β -catenin-1	60 min CC1	32 min	1:100
BOB 1	TG14	90 min CC1	90 min	1:25*
C4d	A213	60 min CC1	32 min	1:10
CA 125	M 11	60 min CC1	32 min	1:50
CA 19-9	1116-NS-19-9	90 min CC1	32 min	1:50
Calcitonin	CL1948	4 min Protease 1	32 min	1:300
Calretinin	DAK Calret1	90 min CC1	90 min	1:25*
Carcino Embryonic Antigen	Policlonal	60 min CC1	32 min	1:1000
CD 1a	010.	60 min CC1	32 min	1:100
CD 3	F7.2.38	60 min CC1	32 min	1:350
CD 5	CD5/54/F6	60 min CC1	32 min	1:250
CD 7	CBC.37	60 min CC1	32 min	1:50
CD 8	C8/144B	60 min CC1	32 min	1:1000
CD 10	56C6	60 min CC1	32 min	1:20
CD 15	BY87	84 min CC2	60 min	1:25
CD 19	LE-CD 19	60 min CC1	32 min	1:100
CD 20	L 26	60 min CC1	32 min	1:500
CD 21	1 F 8	4 min Protease 1	60 min	1:25*
CD 23	MHM6	60 min CC1	32 min	1:150
CD 30	Ber - H2	90 min CC1	60 min	1:30
CD 31	JC70A	60 min CC1	32 min	1:100
CD 34	QBEnd- 10	90 min CC1	32 min	1:100
CD 38	SPC32	60 min CC1	32 min	1:400
CD 43	DF-T1	60 min CC1	32 min	1:300
CD 57	TB 01	60 min CC1	32 min	1:100
CD 68	PGM1	60 min CC1	32 min	1:300
CD 79	HM57	60 min CC1	32 min	1:200
CD 99	12-E7	60 min CC1	32 min	1:100
CD 117	Policlonal	No	32 min	1:100
CD 138	MI 15	90 min CC1	90 min	1:100
CDX2	AMT 28	90 min CC1	90 min	1:25*
c-erbB-2	SP3	60 min CC1	32 min	1:500
Chorionic Gonadotropin	Policlonal	60 min CC1	32 min	1:4000

* Required use of amplifier

AR: Antigen retrieval

Cont. Table 3 Protocols for Ventana Benchmark XT- Automation

Antibodies	Clone	AR	Antibody	
			Incubation	Titer
Cyclin D1	SP4	60 min CC1	32 min	1:150
Cytomegalovirus	CCH2+DDG9	4 min Protease 1	32 min	1:800
Cytokeratin AE1/AE3	AE1/AE3	60 min CC1	32 min	1:1000
Cytokeratin high weight	34βE12	60 min CC1	32 min	1:500
Cytokeratin 5/6	D5/16B4	60 min CC1	32 min	1:200
Cytokeratin 5,6,8,17,19	MNF 116	60 min CC1	32 min	1:100.
Cytokeratin 7	OV-TL 12/30	60 min CC1	32 min	1:400
Cytokeratin 8/18	5D3	60 min CC1	32 min	1:350
Cytokeratin 20	Ks 20.8	60 min CC1	32 min	1:350
Collagen type IV	CIV	90 min CC1	32 min	1:100
Cromogranin	DAK - A3	60 min CC1	32 min	1:250
Desmin	D 33	60 min CC1	32 min	1:150
DOG-1	K9	90 min CC1	32 min	1:100
E-cadherin	NCH-38	60 min CC1	32 min	1:150
Epithelial membrane antigen	E29	60 min CC1	32 min	1:100
Epitelial related antigen	MOC-31	90 min CC1	90 min	1:50*
Epstein-Barr Virus	CS.1-4	60 min CC1	32 min	1:600
Estrogen Receptor	SP1	90 min CC1	32 min	1:50
FVIII	F8-86	4 min Protease 1	32 min	1:50
Follicle stimulating hormone	C10	4 min Protease 1	32 min	1:100
Gross Cystic Disease Fluid Protein-15	23A3	60 min CC1	32 min	1:400
Glial Fibrillary Acidic Protein	6F2	60 min CC1	32 min	1:500
Growth Hormone	Policlonal	Not necessary	32 min	1:3000
Glucagon	Policlonal	Not necessary	32 min	1:200
Granzime B	GrB-7	90 min CC1	90 min	1:50
Hepatocyte	OCH1E5	60 min CC1	32 min	1:300
HHV8	LN 35	60 min CC1	90 min	1:50*
Immunoglobulin A	N1CLA	60 min CC1	32 min	1:200
Immunoglobulin D	DRN1C	60 min CC1	32 min	1:50
Immunoglobulin G	RWP49	60 min CC1	32 min	1:1000
Immunoglobulin M	8H6	60 min CC1	32 min	1:400
Inibin	R 1	90 min CC1	32 min	1:50
Insulin	Policlonal	Not necessary	32 min	1:300
Ki-67	MIB-1	60 min CC1	32 min	1:50
Kappa Light Chains	CH15	60 min CC1	32 min	1:2000
LCA	2B11+PD7/26.	60 min CC1	32 min	1:500
LH	C93	60 min CC1	32 min	1:200
Lambda Light Chains	SHL53	60 min CC1	32 min	1:2000
Lysozyme	Policlonal	Not necessary	60 min	1:500
Mammoglobin	304-1A5	60 min CC1	32 min	1:300

* Required use of amplifier

AR: Antigen retrieval

Cont. Table 3 Protocols for Ventana Benchmark XT- Automation

Antibodies	Clone	AR	Antibody Incubation	Titer
Melan-A	A 103	60 min CC1	32 min	1:100
Melanosome	HMB45	60 min CC1	32 min	1:300
Mesothelial Cell	HBME-1	90 min CC1	32 min	1:100
Muscle actin	HHF35	60 min CC1	32 min	1:300
MUC 1	VU-4-H5	60 min CC1	32 min	1:50
MUC 2	CCP 58	60 min CC1	32 min	1:200
MUC 4	1 G 8	60 min CC1	32 min	1:50
MUC 5 AC	45 M 1	60 min CC1	32 min	1:50
MUM 1	mum1 p	60 min CC1	32 min	1:100
Myeloperoxidase	59A5	60 min CC1	32 min	1:300
Myogenin	F5D1	60 min CC1	32 min	1:100
Myoglobin	MYO18	60 min CC1	60 min	1:400
Napsin A	TMU-Ad02	60 min CC1	32 min	1:500
Neurofilament protein	2F11	60 min CC1	32 min	1:50
Neuron specific enolase	BBS/NC/V I-H14	60 min CC1	32 min	1:500
Oct 2	Policlonal	90 min CC1	90 min	1:50*
P53	DO-7	60 min CC1	32 min	1:200
P63	7JUL	60 min CC1	32 min	1:50
PD1	NAT	60 min CC1	32 min	1:50
Placental alkaline phosphatase	8A9	60 min CC1	32 min	1:100
Podoplanin	D 2 40	90 min CC1	32 min	1:25
Polioma Virus	PAb416	60 min CC1	32 min	1:500
Prolactin	Policlonal	Not necessary	32 min	1:1250
Progesterone Receptor	PgR636	90 min CC1	90 min	1:100*
Prostate Specific Antigen	ER-PR8	Not necessary	32 min	1:100
PS100	Policlonal	60 min CC1	32 min	1:2000
PSMA	3 E 6	90 min CC1	90 min	1:200
Racemase	EPMU1	60 min CC1	32 min	1:100
Renal Cell Carcinoma	SPM 314	60 min CC1	32 min	1:500
Smooth muscle actin	1A4	60 min CC1	32 min	1:500
Synaptophysin	sy-38	90 min CC1	90 min	1:50*
Somatostatin	Policlonal	Not necessary	32 min	1:400
Terminal deoxynucleotidyl transferase	SEN28	60 min CC1	32 min	1:200
TIA1	TIA-1	60 min CC1	32 min	1:100
Thyroid-Stimulating Hormone	0042	60 min CC1	32 min	1:400
Thyroid Transcription Factor 1	SPT24	60 min CC1	32 min	1:600
Thyroglobulin	DAK-Tg6	Not necessary	32 min	1:500
Villin	CWWB1	60 min CC1	32 min	1:300
Vimentin	V9	60 min CC1	32 min	1:2000
WT1	6F-H2	8 min Protease 1	90 min	1:50
ZAP 70	2F3.2	90 min CC1	32 min	1:50

* Required use of amplifier

AR: Antigen retrieval

REFERENCES

1. Brasileiro Filho G et al. *Bogliolo Patologia Geral*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994.
2. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
3. Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. *Manual de Imunohistoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
4. Michalany J. *Técnica Histológica em Anatomia Patológica*. Com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 3ed. São Paulo: Michalany LTDA; 1998.
5. Education Guide Special Stains and H & E. Dako North America. 2thed. California: Carpinteria; 2010. Acesso em 06 Out 2014. Disponível em: http://www.dako.com/08066_special_stains_edugui_de.pdf.
6. Moreau A, Le Neel T, Joubert M, Truchaud A, Laboisie C. Approach to automation in immunohistochemistry. *Clin Chim Acta*. 1998 Dec; 278 (2): 177-84.
7. Jackson P e Blythe D. Immunohistochemical techniques. In: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. 6th ed, Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2008.
8. Matolcsy A. *Immunophenotypic Markers in the Diagnosis of Non-Hodgkin's Lymphomas*. Immunophenotypic Analysis. 2ed. Georgetown: Eurekah; 2005.
9. Lu J, Chang KL. Practical Immunohistochemistry in Hematopathology: A Review of Useful Antibodies for Diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2011 Mar; 18(2): 133-51.
10. Anderson GG, Weiss LM Determining tissue of origin for metastatic cancers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010 Jan; 18 (1): 3-8.
11. Krishna M. Diagnosis of metastatic neoplasms. An immunochemical approach. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Feb. 134: 207-215.
12. Kloppel G. Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007 Mar; 21(1):15–31.
13. Klimstra DS, Modlin IR, Adsay NV, Chetty R, Deshpande V, Gönen M, et al. Pathology Reporting of Neuroendocrine Tumors: Application of the Delphic Consensus Process to the Development of a Minimum Pathology Data Set. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar. 34 (3): 300-13.
14. Feldstein JT. The immunohistochemistry Laboratory: looking at molecules and preparing for tomorrow. 2010 Nov; *Arch Pathol Lab Med*, 134(11):1659-65.
15. Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Ruffo Freitas-Júnior R. Subtipos moleculares do câncer de mama. *Femina*. 2011 Out. 39(10):499-503.
16. Cianfrocca M, Gradishar W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. *Ca Cancer J Clin*. 2009 Sep/Oct; 59(5): 303–313.
17. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol* 2012 Sep; 23(10): x207-x210. Acesso em 6 outubro 2014. Disponível em: <http://annonc.oxfordjournals.org>
18. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *Oncologist* 2004; 9(6): 606-16.[Acesso em 7 out 2014]. Disponível em: <http://theoncologist.alphamedpress.org>
19. Procop GW, Wilson M. Infectious Disease Pathology. *Medical Microbiology*. *Clin Infect Dis*. 2001Jun. 32(11):1589-1601.
20. Hsi ED. A practical approach for evaluating new antibodies in the clinical immunohistochemistry laboratory. 2001 Feb; 125(2):289-94.
21. Marques, CH. Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial, aplicação terapêutica. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. [Mestrado]. Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular. 2005.
22. Cang S, Mukhi N, Wang K, Liu D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J Hematol Oncol*. 2012 Oct; 5 (54): 1-9.
23. Wada N, Aozasa K. Loss of CD20 Expression after Rituximab Therapy for B-Cell Lymphomas: A Review of the Literature. *Cancer and Clinical Oncology* 2012 May; 1(2): 1-9.
24. Eisenberg ALA e Koifman S. Câncer de mama: Marcadores Tumorais (Revisão de Literatura). *Rev Bras Cancerol*. 2001; 47(4): 377-388.
25. Bartlett JMS, Brookes CL, Robson T, Van de Velde CJH, Billingham LJ, Campbell FM, et al. Estrogen Receptor and Progesterone Receptor As Predictive Biomarkers of Response to Endocrine Therapy: A Prospectively Powered Pathology Study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational Trial. *J Clin Oncol*. 2011Apr. 29(12): 1531- 1538.
26. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet*. 1998 May; 351(9114): 1451-67.
27. Rosai J, Ackerman's LV. *Surgical Pathology*. 9th ed. Mosby: Edinburgh, 2004.
28. Coons AH, Creech HJ, Jones R N, Berliner E. The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *J Immunol* 1942 Nov; 45 (3): 159–170.

29. Haines DM, West KH. Immunohistochemistry: Forging the links between immunology and pathology. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005 Oct 18; 108(1-2): 151-6.
30. Chetty R, O'Leary VJ, Gatter KC. Immunocytochemistry as a diagnostic tool. *Curr Diagn Pathol* 1995 Mar; 2(1): 38-45.
31. Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42(4): 405-426.
32. Ezaki T. Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: Its potential drawbacks and optimization for double immunostaining. *Micron.* 2000 Dec; 31(6): 639-49.
33. Shi SR, Taylor CR. Antigen Retrieval. In: Taylor CR, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide.* 6th ed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013.30-42. [Acesso em 20 Out 2014]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf
34. Taylor CR. Introduction to Immunohistochemistry In: Taylor, CR, Rudbeck, L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide.* 6th ed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013.10-17. [Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf
35. Eisen R.N. Quality management in immunohistochemistry. *Diagn Histopatol.* 2008 Jul. 14(7):299-307.
36. Lin F, Chen Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry. Literature review and Geisinger experience. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Dec; 138(12):1564-77.
37. Goldstein NS, Hewitt SM, Taylor CR, Yaziji PH, Hicks DG and members of Ad-Hoc Committee on Immunohistochemistry Standardization. Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007 Jun; 15(2): 124-33.
38. Taylor CR, Shi SR, Barr NJ e Wu N. Techniques of Immunohistochemistry: principles, pitfalls and standardization. In: Dabbs, D.J. *Diagnostic Immunohistochemistry.* 2th ed Philadelphia. Elsevier. 2006.1-27.
39. Engel KB, Moore HM. Effects of Preanalytical Variables on the Detection of Proteins by Immunohistochemistry in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2011 May; 135(5): 537-43.
40. Pollard K, Lunny D, Holgate CS, Jackson P, Bird OC. Fixation, Processing, and Immunochemical Reagent Effects on Preservation of T-Lymphocyte Surface Membrane Antigens in Paraffin-embedded Tissue. *J Histochem Cytochem.* 1987 Nov; 35 (11): 1329-38. [Acesso em 07 Feb 2015]. Disponível em: <http://jhc.sagepub.com/content/35/11/1329.long>
41. Hladik CL e White CL. Immunohistochemistry quality control. In: Bancroft J.D. e Gamble, M. *Theory and practice of histological techniques.* 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2008.
42. Nakhleh RE. What is quality in surgical pathology? *J Clin Pathol.* 2006 Jul; 59(7): 669-672.
43. Nielsen S. Selection of the Primary Antibody. In: Taylor, CR, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide.* 6th ed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013.46-57. [Acesso em 20 out 2014]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf
44. Petersen K e Hans Christian Pedersen HC. Immunohistochemistry Staining Methods. In: Taylor CR, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide.* 6th ed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013.78-91. [Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf
45. Lars Jacobsen L, Nielsen M, Månsson S, Rudbeck L. Staining protocol optimization. In: Taylor CR e Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide.* 6th ed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013. 60-76. [Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf
46. Caputo LFG, Gitirana LB, Manso PPA. Técnicas histológicas. Em: Molinaro, EM. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.* Rio de Janeiro: EPSJV; 2010.
47. Barra MB. O uso da imunistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da AMRIGS,* 2006 Abr-Jun. 50(2):173-184.
48. College of American Pathologists. Surveys and anatomic pathology education programs. [Acesso em 12 Fev 2015] Disponível em: <http://viewer.zmags.com/publication/f0c1b379#f0c1b379/1>
49. Colley EC, Stead RH. Fixation and Other Pre-Analytical Factors. In: Taylor CR, e Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide.* 6th ed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013. 20-29. [Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf
50. Riera JR. Automation in immunohistochemistry. *Rev Esp Pat Spain.* 1999; 32(3): 359-360.

51. Sattler A. Automated Staining: Ventana Perspective. In: Lin F, Prichard J, Liu H, Wilkerson M e Schuerch C. Handbook of practical immunohistochemistry- Frequently asked questions. New York: Springer Science+Business Media, 2011. [Acesso em 07 Jan 2015]. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=wR6Y6FhgyRsC&printsec=frontcover&dq=Handbook+of+practical+immunohistochemistry&hl=pt-BR&sa=X&ei=t8atVMLfBsPSeqD7qcgJ&redir_esc=y#v=onepage&q=Handbook%20of%20practical%20immunohistochemistry&f=false
52. Myers J. A review of automated slide stainers for IHC and ISH. MLO. 2008 Jan; 41-44.
53. Rasmussen OF. Automation in IHC. In: Taylor CR, Rudbeck, L. Immunohistochemical Staining Methods Education Guide. 6th ed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013. 110-119. [Acesso em 20 Jan 2015] Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_method.pdf
54. Ventana Medical Systems, Inc. BenchMark XT-Ventana® [Internet]. Tucson, Arizona. . [Acesso em 10 Dez 2014] Disponível em: http://www.ventana.com/documents/BMK_XT_Spec_sheet_web.pdf
55. Ventana Medical Systems, Inc. UltraView Universal DAB Detection Kit [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 11 Dez 2014] Disponível em: <http://www.ventana.com/product/1414?type=1791>
56. Ventana Medical Systems, Inc. EZ Prep [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=eZ+prep&Search.x=0&Search.y=0>
57. Ventana Medical Systems, Inc. Liquid Coverslip. [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=lcs&Search.x=0&Search.y=0>
58. Ventana Medical Systems, Inc. Sodium Chloride Sodium Citrate buffer [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/product/1361?type=1733>
59. Ventana Medical Systems, Inc. Reaction Buffer Concentrate [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=reaction+buffer+concentrate&Search.x=0&Search.y=0>
60. Ventana Medical Systems, Inc. Cell conditioning 1 [Internet]. Tucson, Arizona. . [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=cc1&Search.x=0&Search.y=0>
61. Ventana Medical Systems, Inc. Cell conditioning 2 [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=cc2&Search.x=0&Search.y=0>
62. Ventana Medical Systems, Inc. Silver Wash II [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 11 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=silver+wash+II&Search.x=5&Search.y=9>
63. Ventana Medical Systems, Inc. Protease 1 [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 08 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/product/213?type=226>
64. Alves VAF, Leandro LO, Vassallo J, Pereira EM, Kanamura CT, Wakamatsu A, et al. Controle de qualidade interlaboratorial em imuno-histoquímica: citoceratinas e receptor de estrógeno como modelo. J Bras Patol Med Lab jun 2004 Jun; 40(3): 175-183.
65. Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH, Key M, Welcher R, Harvey R et al. Métodos Imunohistoquímicos de Coloración. 3 ed. Argentina: Facultad de Ciencias Médicas UNLP, 2002.
66. Prichard, JW. Overview of Automated Immunohistochemistry. Arch Pathol Lab Med. 2014 Dec; 138: 1578-82.

5 RESULTADOS

Quando o laboratório adquire uma plataforma de automação que ofereça a possibilidade de utilização de anticorpos que não estão prontos para uso, haverá a etapa de padronização. A padronização *In House* serve para garantir a reprodutibilidade e resultados corretos a cada reação, aplicando-se tanto a padronização de um anticorpo na técnica manual quanto a um anticorpo que será utilizado na automação (Taylor, 2013). Os protocolos padronizados neste estudo constam na tabela do Anexo II e no Manual Ilustrado no Anexo V.

❖ Validação da padronização

A validação da padronização foi realizada através da avaliação das lâminas após cada teste, por dois patologistas do serviço onde o estudo foi realizado de acordo com os critérios que constam na tabela 4.

Tabela 4. Critérios de avaliação dos protocolos testados

1- Reatividade específica	2- Qualidade da técnica	3- Background
Reatividade para o antígeno	Avaliação do corte: Contra-coloração Descolamento Presença de artefatos	Avaliação da coloração de fundo
Graduação	Graduação	Graduação
0- ausente	0- insatisfatório	0- ausente
1- fraca	1- regular	1- pouco
2- satisfatória		
3- muito intensa	2- satisfatório	2- acentuado

Modificado de ALVES, VAF *et al.* J Bras Patol Med Lab.2004

Após a avaliação das lâminas, quando a marcação não foi satisfatória foi seguido o algoritmo da (Fig. 27) para a tomada de decisão quanto a alteração no protocolo de cada anticorpo.

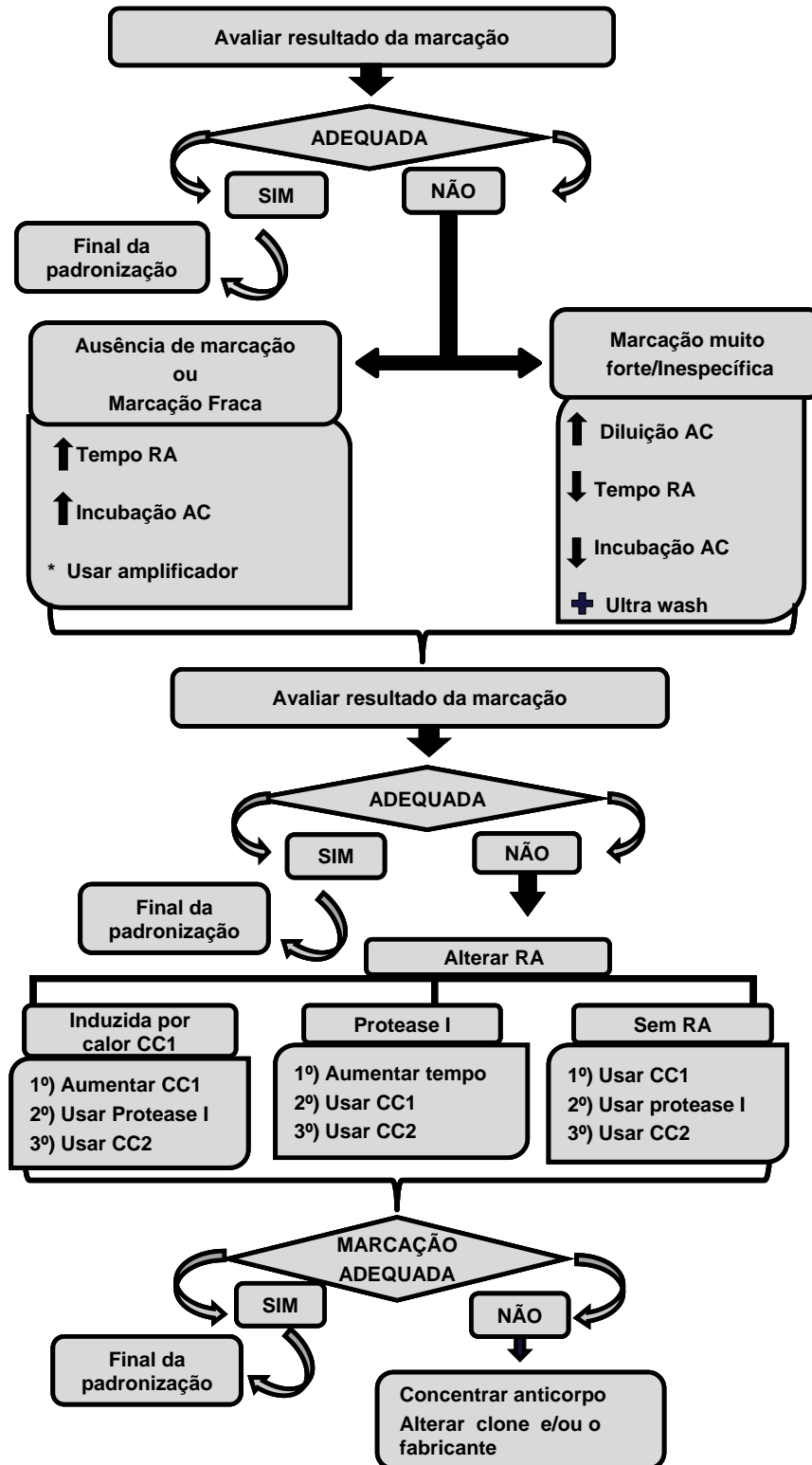


Fig. 27 Algoritmo de decisão para elaboração de novos protocolos de teste

Fonte: Elaborado pelo autor

❖ Recuperação Antigênica

O uso de técnicas de indução de recuperação de epítomos pelo calor permite, aumento de sensibilidade, redução tempo de incubação e maior diluição dos anticorpos. Entretanto, a escolha de um tampão inadequado para determinado antígeno pode trazer resultados falso-positivos ou falso-negativos. O tempo em que o tecido permanecerá nestes tampões também pode levar a resultados equivocados (Eisen, 2008).

Quanto a recuperação antigênica os dados obtidos neste estudo (Tabela 5) revelam que a maioria dos anticorpos (85%) se beneficiam com o uso de recuperação antigênica por 60 minutos calor em *Cell Conditioning 1* (pH 9,0).

Tabela 5 - Tipo de Recuperação Antigênica

Recuperação Antigênica	Número de Marcadores	%
Necessário Recuperação Antigênica		
Calor		
CC1	102	85,00
CC2	1	0,83
Digestão enzimática	6	5,00
Não necessário Recuperação Antigênica		
	11	9,17

CC1: Cel Conditioning 1; CC2: Cel Conditioning 2

Dos anticorpos que se beneficiaram da recuperação antigênica com CC1 (102), 79 tiveram como resultado uma coloração satisfatória com 60 minutos em CC1 e 23 anticorpos tiveram uma coloração satisfatória com 90 minutos de CC1 (Gráfico 1).

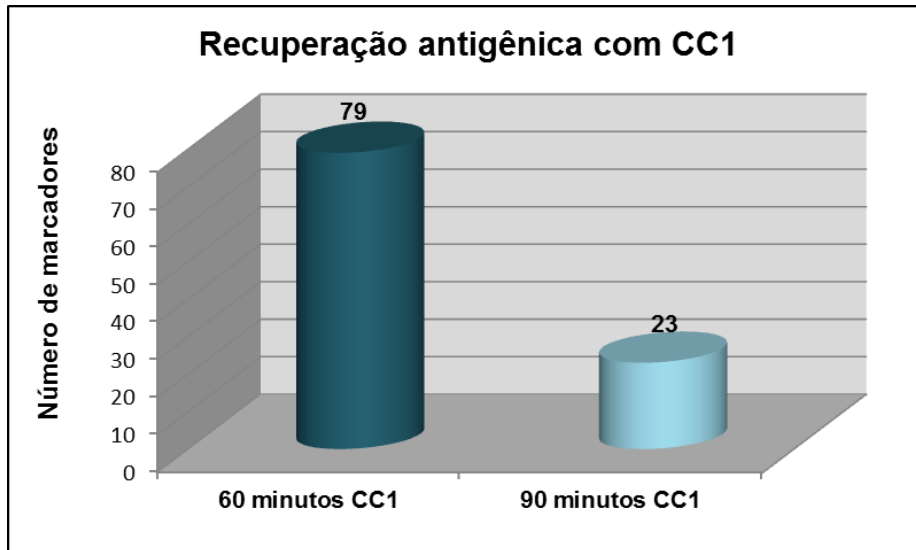


Gráfico 1. Recuperação antigênica com CC1

Fonte: Elaborado pelo autor

❖ Diluição

Ainda que o uso da automação ofereça um microambiente constante e padronizado para as reações, neste estudo, houve a necessidade de utilizar os anticorpos com diluições mais concentradas em relação as diluições utilizadas na técnica manual para obter um bom resultado na coloração das lâminas da automação (Gráfico 2).

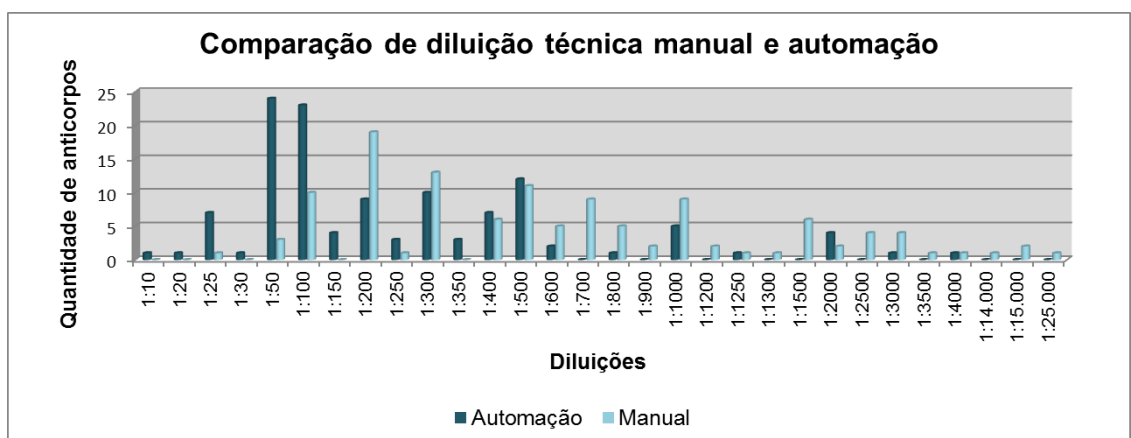


Gráfico 2. Comparação entre diluições anticorpos no método manual e método automatizado

Fonte: Elaborado pelo autor

A diluição dos anticorpos variou de 1:10 a 1:4000, pelo menos 69% dos anticorpos testados apresentaram uma coloração satisfatória nas faixas de diluição 1:10 a 1:300 (Gráfico 3).

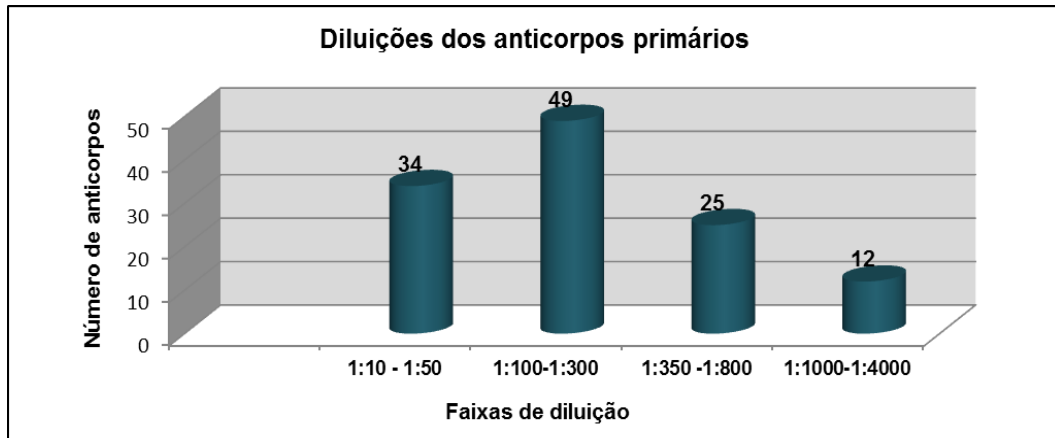


Gráfico 3. Diluições dos anticorpos para plataforma de automação

Fonte: Elaborado pelo autor

Este fato pode ser devido ao tempo de incubação dos anticorpos primários que na técnica manual era de pelo menos 14 horas overnight na geladeira numa temperatura entre 2-8 °C, e que no equipamento é de no máximo 90 minutos a 42 °C.

❖ **Uso de amplificador**

Onze anticorpos apresentaram coloração satisfatória somente após a introdução do amplificador no protocolo, junto ao kit de detecção. Os anticorpos que se beneficiaram do uso do amplificador foram: Bcl2, Bcl6, BOB1, Calrretinina, CD 21, CDx2, Antígeno relacionado ao epitélio, HHV8, OCT2, Receptor de progesterona, Sinaptofisina.

❖ Incubação com anticorpos

O tempo de incubação no anticorpo primário foi de no mínimo 32 minutos (83,3% dos marcadores) e no máximo de 90 minutos (Gráfico 4).

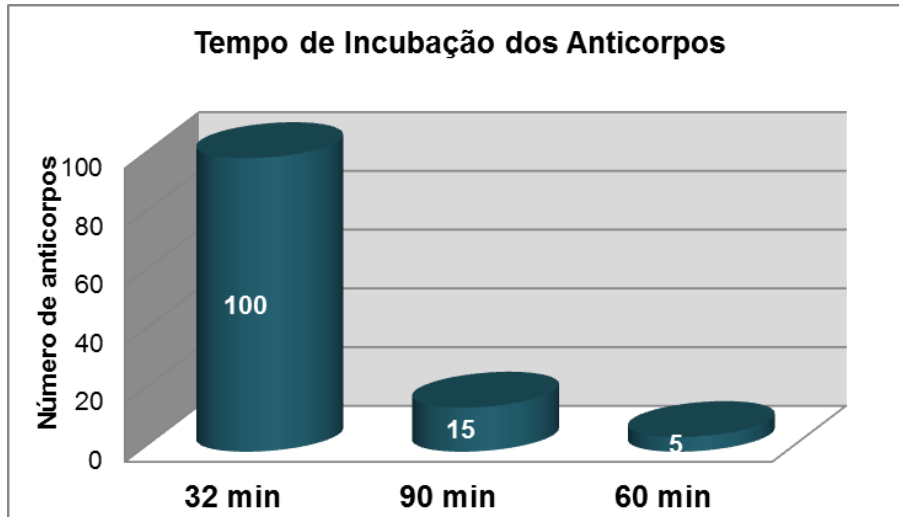


Gráfico 4. Tempo de incubação dos anticorpos

Fonte: Elaborado pelo autor

❖ Contra-coloração e diferenciação

O tempo de contra-coloração com a hematoxilina mais frequentemente utilizado foi de 12 minutos (84%), superior ao tempo aplicado na técnica IHQ manual (em nossa experiência de 1 a 2 minutos). O tipo de hematoxilina utilizada nesta padronização (Hematoxilina de Mayer modificada) pode ser o motivo pelo qual foi necessário aumentar o tempo na contra-coloração.

Quanto ao tempo de pós-contra-coloração com *Bluing* foi seguida a indicação do fabricante para os anticorpos prontos para uso de 4 minutos em todos os testes.

❖ Fabricantes testados na plataforma de automação Benchmark XT

Quanto a variedade de fabricantes testados todos resultaram em marcação positiva. No estudo os anticorpos das marcas Dako e Novocastra foram utilizados em 89% dos testes. Os fabricantes agrupados na categoria outros foram: Zymed (3), ARP (1), Calbiochem (1), DBS (1), Quidel (1), Santa Cruz Biotechnology (1) e Spring Bioscience (1). Esta variedade de fabricantes que tiveram seus reagentes testados e aprovados para uso no equipamento indica que é viável permanecer utilizando os anticorpos concentrados que o laboratório já possui (Gráfico 5).

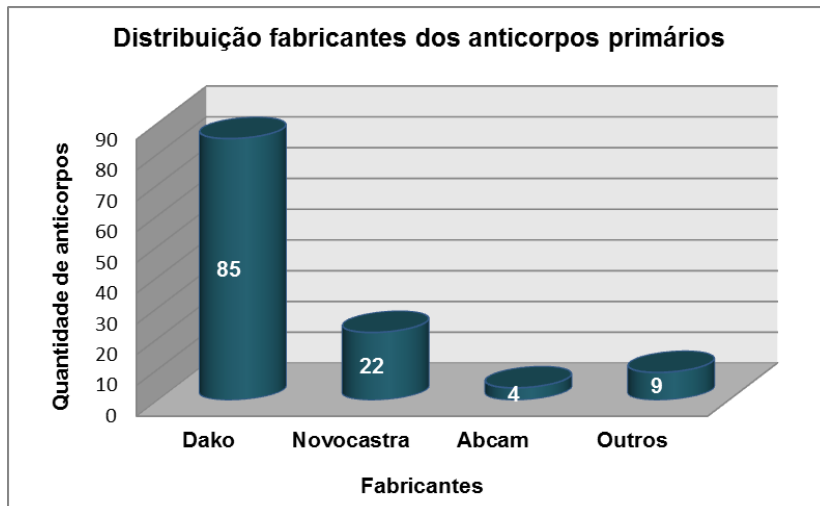


Gráfico 5. Fabricantes testados

Fonte: Elaborado pelo autor

O anticorpo primário pronto para uso específico para o equipamento está totalmente otimizado, os tempos de incubação e de recuperação antigênica são, neste caso, geralmente menores. No entanto, estes reagentes apresentam um valor comercial mais elevado em relação ao anticorpo concentrado.

Quanto ao volume, os anticorpos prontos para uso são de 5 mL e tem o rendimento de 50 testes e os concentrados dependendo da diluição podem atingir um número de testes bem superior.

❖ Análise dos prazos de validade dos anticorpos testados

Foram levantados neste estudo os prazos de validade de 119 dos 120 anticorpos utilizados, 30,2% dos anticorpos tinham seu prazo de validade expirado no período dos testes para a padronização que ocorreram de janeiro a dezembro de 2012 (Gráfico 6).

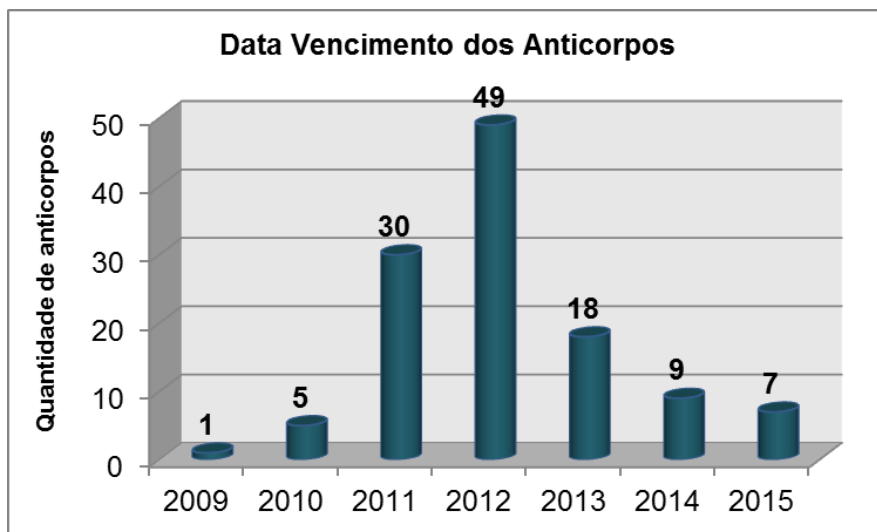


Gráfico 6. Prazos de validade dos anticorpos

Fonte: Elaborado pelo autor

❖ Análise estatística

O teste estatístico utilizando SPSS, foi aplicado com a finalidade de verificar se as variáveis diluição e validade estavam correlacionadas, com o objetivo de inferir se o uso de anticorpos expirados teve influência nas diluições obtidas. O nível de significância foi fixado em 5% ($p < 0,05$).

O resultado da correlação de Spearman foi $r = ,090$ e um valor $p = ,332$ sem significado estatístico, demonstrando que não houve correlação linear entre as duas variáveis. Portanto a validade e a diluição do anticorpo não estão correlacionadas

nesta amostra, indicando que o fato de o anticorpo estar expirado não interferiu nas faixas de diluição utilizadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Serviço de Anatomia Patológica do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre está localizado no Hospital Santa Rita especializado em oncologia e é considerado um centro de referência nesta área. A pesquisa teve por objetivo a criação de um banco de dados e um manual sobre o processo de automação para os marcadores imuno-histoquímicos mais utilizados neste laboratório. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (Parecer N° 332.213), anexo VII.

Existem grandes avanços quanto as plataformas de automação disponíveis no mercado, mas ainda não existe um único método padronizado aplicável a detecção de todos os antígenos. A padronização de anticorpos concentrados para automação deve ser criteriosamente realizada, afim de que uma vez estabelecido o protocolo este seja de fato o melhor.

O processo de padronização em instituições que dispõem de um número grande de anticorpos, pode se tornar uma tarefa árdua. Provavelmente um fator que dificulta esta padronização seja o tempo de dedicação necessário para encontrar o melhor protocolo para cada anticorpo.

A exigência por reprodutibilidade nos testes combinada ao aumento da demanda por medicamentos e resultados precisos justifica a automação que neste contexto, afasta muito a variabilidade ligada ao técnico, não substituindo a importância de experiência e qualificação do mesmo (Taylor, 2013).

São muitos os fatores que impossibilitam o estabelecimento de um protocolo padrão universal para a IHQ, entretanto a padronização de protocolos tem sido um objetivo nos laboratórios. Cabendo a cada laboratório escolher e validar a

combinação ideal de reagentes e protocolos para cada anticorpo (Eisen, 2008; Taylor, 2013).

O sistema testado neste estudo tem por característica a flexibilidade de uso de anticorpos concentrados oriundos de outros fabricantes, é recomendada uma análise sobre as recomendações do fabricante do anticorpo para um ponto de partida na padronização quanto a recuperação antigênica, diluição e controle positivo ideal.

Definida a diluição para o teste, o anticorpo deve ser diluído cuidadosamente em diluente apropriado e o protocolo de titulação permite que o anticorpo que está sendo titulado seja pipetado sobre a lâmina manualmente, o volume indicado é de 100 μ l (Fig. 28).



Fig. 28 Titulação de anticorpo

Fonte: Elaborado pelo autor

Após a etapa de titulação, é necessária a avaliação do patologista da marcação obtida por microscopia de luz. A presença do técnico neste momento onde é definido se haverá a necessidade de fazer alguma modificação no protocolo testado, facilita o acerto na próxima alteração do protocolo para que os resultados sejam satisfatórios.

Os protocolos personalizados para cada marcador, se considerados satisfatórios, devem ser armazenados no *software* pelo nome do marcador para uso posterior no laboratório.

Depois de definida a diluição ideal, para que os anticorpos de outros fabricantes possam ser utilizados com praticidade semelhante a oferecida pelos anticorpos pré-diluídos, é necessário que se dilua volumes maiores e se acondicione nos prepkits próprios para esta finalidade (Fig. 29,30).



Fig. 29 Prepkit para diluição de anticorpos

Fonte: Elaborado pelo autor

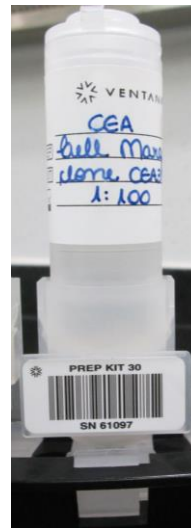


Fig. 30 Prepkit identificado

A diluição de grandes volumes (mais de 5 mL) de anticorpo após a padronização não é recomendada, é importante que o usuário conheça a demanda de utilização do anticorpo para que o reagente não permaneça diluído no prepkit por mais tempo do que o necessário e exposto repetidas vezes a temperatura ambiente desnecessariamente.

Quando for necessário diluir mais anticorpo com a finalidade de recarregar o prepkit, deve-se descartar o anticorpo restante no prepkit evitando assim colocar o

novo anticorpo diluído em cima do que já estava em uso, pois esta prática irá alterar a concentração do anticorpo determinada na titulação.

Cuidados com a retirada dos lacres que acompanham os prepkits com reagentes da Ventana como anticorpos, kit de detecção, hematoxilina e *Bluing* podem evitar que uma corrida seja perdida.

Se o laboratório possuir uma rotina manual padronizada e preferencialmente alguma certificação de qualidade externa, é recomendável que se escolha algum anticorpo crítico quanto a obtenção de marcação positiva para a execução da técnica manual e no equipamento concomitantemente.

A etapa de padronização possui um alto custo ao laboratório, pois mesmo em período de teste para adequar seus anticorpos primários ao equipamento, o laboratório estará pagando pela lâmina e pelos funcionários para que realizem o trabalho.

Após a padronização, o ideal é uma criteriosa avaliação da reprodutibilidade de desempenho dos anticorpos, com o maior número de amostras possível para aumentar a segurança quanto a precisão dos resultados obtidos.

O manual do equipamento contém informações relevantes quanto as manutenções recomendadas, criação de protocolos e gerenciamento das soluções. Nenhuma forma de automação dispensa um profissional preparado para lidar com o equipamento. Em nossa experiência deve ser dada uma atenção especial ao gerenciamento e compra dos reagentes, pois expirada a data de validade o equipamento não funciona até que registre outro reagente com uma validade aceitável.

As lâminas eletricamente carregadas recomendadas para uso no equipamento possuem algumas particularidades para que suas propriedades estejam garantidas, entre elas destacam-se: não tocar as lâminas sem o uso de luvas, não armazená-las em local úmido, não mergulhar as lâminas mais de uma vez na água do banho-maria no momento do corte, sob o risco de despolarização e não uniformidade na distribuição dos reagentes.

Um bom treinamento de todos os envolvidos no processo é recomendado, bem como o entendimento de pontos básicos como a diluição do anticorpo. Quando se realiza a recarga nos prepkits a diluição do anticorpo deve ter sua rastreabilidade garantida através de um registro, caso seja necessário associar a diluição a alguma intercorrência com um marcador em específico.

Também requer atenção a diluição correta de fluídos volumosos e a utilização de uma água destilada sem contaminantes, o uso de estações purificadoras para fornecimento de água destilada requer manutenção e controle microbiológico periódicos.

O sistema testado permite a rastreabilidade dos reagentes registrados no equipamento, da sua utilização nas sessões de trabalho, e do tempo de duração da técnica realizada pelo equipamento, fornecendo informações valiosas para o usuário e para o administrador do setor.

O manual resultante deste estudo contém ilustrações de todos os anticorpos testados nesta plataforma de automação e aprovados para uso no laboratório. Informamos também neste material o protocolo detalhadamente, a diluição, tempo de recuperação antigênica e tempo de incubação no anticorpo primário, o tecido

utilizado como controle positivo, os clones e fabricantes dos anticorpos que utilizamos.

O tempo de processamento das lâminas na automação pode ser até 4 vezes menor em relação a imuno-histoquímica manual utilizando-se a técnica de incubação do anticorpo *overnight*. Na técnica *overnight*, somente a etapa de incubação é de aproximadamente 14 horas, além disso ainda existem outras etapas como recuperação antigênica, resfriamento, bloqueio da peroxidase endógena, e incubação com kit de detecção e cromógeno que podem acrescentar até duas horas a mais no processamento das lâminas. Na automação o protocolo mais extenso não excedeu 4 horas.

A automação imprime uma nova rotina de trabalho no laboratório, na medida em que elimina os incontáveis passos de secar e pingar centenas de lâminas. No entanto, as particularidades associadas ao uso da automação devem ser plenamente compreendidas e atendidas e isso está ligado a habilidade do técnico em participar ativamente desta transição e ter disponibilidade para o constante aprendizado.

Em nossa experiência a transição não foi a simples transferência de protocolos e diluições utilizadas na rotina manual para a automação. O manual elaborado e os dados obtidos neste estudo devem ser utilizados como um guia para laboratórios que queiram migrar para esta plataforma de automação, servindo como referência ao processo de padronização dos anticorpos incluídos nesta amostra. Os benefícios da automação na IHQ atendem às exigências de maior padronização concomitante ao aumento da demanda, aderir a automação parece ser uma forma menos complexa e mais segura de realizar a imuno-histoquímica.

7 BIBLIOGRAFIA

Abreu EB, Martinez P, Betancourt L, Romero G, Godoy A, Bergamo L. Treatment plan for breast cancer with sentinel node metastasis. *Ecancer*. 2014 Jan; 8(383):1-7.

Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses and Human Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2006; 577:1-18.

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al. *Fundamentos da Biologia Celular, uma Introdução à Biologia Molecular da Célula*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 1999.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. *Manual de Imunohistoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Anderson GG, Weiss LM. Determining tissue of origin for metastatic cancers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010 Jan; 18(1):3-8.

Athanasou NA, Quinn J, Heryet A, Woods CG e , J O'D Mc'gee Jo'd. Effect of decalcification agents on immunoreactivity of cellular antigens. *J Clin Pathol*. 1987 Aug; 40 (8):874-8.

Badwal S, Chopra GS, Varma PP, Hooda BA. BK polyoma viral infection in renal allograft recipients. *Armed Forces Med J India*. 2011 Apr; 67(2):122–130.

Barra MB. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da AMRIGS*, 2006 Abr-Jun. 50(2):173-184.

Bartlett JMS, Brookes CL, Robson T, Van de Velde CJH, Billingham LJ, Campbell FM, et al. Estrogen Receptor and Progesterone Receptor As Predictive Biomarkers of Response to Endocrine Therapy: A Prospectively Powered Pathology Study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational Trial. *J Clin Oncol*. 2011 Apr. 29(12):1531- 1538.

Beimler J, Sommerer C, Zeierl M. The influence of immunosuppression on the development of BK virus nephropathy—does it matter? *Nephrol Dial Transplant*. 2007 22 (8): viii66–viii71.

Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH, Key M, Welcher R, Harvey R et al. *Métodos Imunohistoquímicos de Coloración*. 3 ed. Argentina: Facultad de Ciencias Médicas UNLP, 2002.

Boenisch T, Revisado por: Jensen SS. Basic Immunohistochemistry. In: Taylor, C.R. e Rudbeck, L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide*. 6ed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013; 208-214. [Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf

Boenisch T. Revisão Jensen SS. Antibodies. Em: Taylor CR, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide*. 6th ed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013. 198-205. [Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf

Brasileiro Filho G. Bogliolo *Patologia Geral*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994.

Campbell AM. General properties and applications of monoclonal antibodies. In: *Monoclonal Antibody Technology: The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas*. New York: Elsevier; 1984. [Acesso em 15 Fev 2015]. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=5Ff32keTAjMC&pg=PA11&lpg=PA11&dq=avidity+of+monoclonal+antibodies&source=bl&ots=oODwspf9p8&sig=xr9y3xIBZGoH82-Sf2UunFPo5bs&hl=pt-BR&sa=X&ei=3aTqVP_xHIGBqwTIh4S4Bg&ved=0CEcQ6AEwBA#v=onepage&q=avidity%20of%20monoclonal%20antibodies&f=false

Cang S, Mukhi N, Wang K, Liu D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J Hematol Oncol*. 2012 Oct; 5 (54):1-9.

CAP clinical immunohistochemistry checklist 2013 for anatomy pathology. . [Acesso em 12 Fev 2015]. Disponível em: <http://www.cap-acp.org/publicFiles/CAP%20ACP%20NSC%20IHC%20Checklists%20English.pdf>

Caputo LFG, Gitirana LB, Manso PPA. Técnicas histológicas. Em: Molinaro, EM. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; 2010.

Carcoforo P, Bergossi L, Basaglia E, Soliani G, Querzoli P, Zambrini E, et al. Prognostic and therapeutic impact of sentinel node micrometastasis in patients with invasive breast cancer. *Tumori*; 2002. May-Jun; 88(3):S4-5.

Cerski, MR. Tumores estromais gastrointestinais (GIST): aspectos anatomo-patológicos, clínicos e moleculares: série de 85 casos. Porto Alegre. [Doutorado] Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

Chetty R, O'Leary VJ, Gatter KC. Immunocytochemistry as a diagnostic tool. *Curr Diagn Pathol* 1995 Mar; 2(1):38-45.

Chu PG, Loera S, Huang Q, Weiss LM. Lineage Determination of CD20– B-Cell Neoplasms An Immunohistochemical Study. *Am J Clin Pathol* 2006 Oct; 126(4): 534-544.

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *Oncologist* 2004; 9(6): 606-16.[Acesso em 7 out 2014]. Disponível em: <http://theoncologist.alphamedpress.org>

Cianfrocca M, Gradishar W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. *Ca Cancer J Clin*. 2009 Sep/Oct; 59(5): 303–313.

Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Ruffo Freitas-Júnior R. Subtipos moleculares do câncer de mama. *Femina*. 2011 Out. 39(10):499-503.

College of American Pathologists. Surveys and anatomic pathology education programs. [Acesso em 12 Fev 2015] Disponível em:<http://viewer.zmags.com/publication/f0c1b379#/f0c1b379/1>

Colley EC, Stead RH. Fixation and Other Pre-Analytical Factors. In: Taylor CR, e Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide*. 6thed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013. 20-29. [Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf

Coons AH, Creech HJ, Jones R N, Berliner E. The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *J Immunol* 1942 Nov; 45 (3): 159–170.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet*. 1998 May; 351(9114): 1451-67.

Eisen R.N. Quality management in immunohistochemistry. *Diagn Histopatol*. 2008 Jul. 14(7):299-307.

Eisenberg ALA e Koifman S. Câncer de mama: Marcadores Tumorais (Revisão de Literatura). *Rev Bras Cancerol*. 2001; 47(4): 377-388.

Elias JM. Infectious Organisms: Meeting - The New Challenge in Surgical Pathology. *J Histotechnol*. 1995 Sep. 18(3):177-178.

Engel KB, Moore HM. Effects of Preanalytical Variables on the Detection of Proteins by Immunohistochemistry in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 May; 135(5): 537-43.

Ezaki T. Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: Its potential drawbacks and optimization for double immunostaining. *Micron*. 2000 Dec; 31(6):639-49.

Feldstein JT. The immunohistochemistry Laboratory: looking at molecules and preparing for tomorrow. 2010 Nov; *Arch Pathol Lab Med*, 134(11):1659-65.

Ghiluși M, Pleșea IE, Comănescu M, Enache SD, Bogdan F. Preliminary study regarding the utility of certain Immunohistochemical markers in diagnosing neurofibromas and schwannomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2009;50(2):195-202.

Gobardhan PD, Elias SG, Madsen EV, Bongers V, Ruitenbergh HJ, Perre CI, et al. Prognostic value of micrometastases in sentinel lymph nodes of patients with breast carcinoma: a cohort study. *Ann Oncol*. 2009 Jan; 20 (1):41-8.

Goldstein NS, Hewitt SM, Taylor CR, Yaziji PH, Hicks DG and members of Ad-Hoc Committee on Immunohistochemistry Standardization. Recommendations for

improved standardization of immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007 Jun; 15(2): 124-33.

Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol*. 2008 May; 21:S8–S15.

Gupta E, Bhalla P, Khurana. *Histopathology For the Diagnosis Of Infectious Diseases*. *Indian J Med Microbiol*, 2009. 27(2):100-6.

Haines DM, West KH. Immunohistochemistry: Forging the links between immunology and pathology. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005 Oct 18; 108(1-2):151-6.

Hirsch HH. BK Virus: Opportunity Makes a Pathogen. *Clin Infect Dis*. 2005 Aug; 41(3):354-60.

Hladik CL e White CL. Immunohistochemistry quality control. In: Bancroft J.D. e Gamble, M. *Theory and practice of histological techniques*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2008.

Hsi ED. A practical approach for evaluating new antibodies in the clinical immunohistochemistry laboratory. 2001 Feb; 125(2):289-94.

Hugh J, Hanson J, Cheang MCU , Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C. Breast Cancer Subtypes and Response to Docetaxel in Node-Positive Breast Cancer: Use of an Immunohistochemical Definition in the BCIRG 001 Trial. *J Clin Oncol* 2009; (27): 1168–1176.

Jackson P e Blythe D. Immunohistochemical techniques. In: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. 6th ed, Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2008.

Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:523-31.

Janeway CA, Jr TP, Walport M, Shlomchik MJ. Ferramentas dos imunologistas. Tradução Ana Crisitina Arámburu da Silva, et al. In: *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Kamino H, Tam ST: Immunoperoxidase technique modified by counterstain with azure B as a diagnostic aid in evaluating heavily pigmented melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol* 1991 Dec; 18(6): 436-9.

Klimstra DS, Modlin IR, Adsay NV, Chetty R, Deshpande V, Gönen M, et al. Pathology Reporting of Neuroendocrine Tumors: Application of the Delphic Consensus Process to the Development of a Minimum Pathology Data Set. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar. 34 (3):300-13.

Kloppel G. Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007 Mar; 21(1):15–31.

Kovacs K, Horvath E, Vidal S. Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 2001 Sep; 54 (2):121–127.

Krishna M. Diagnosis of metastatic neoplasms. An immunochemical approach. *Arch Pathol Lab Med.* 2010 Feb. 134: 207-215.

Kumar GL, Gill GW. Introduction to Special Stains. George L. Kumar GL, Kiernan JA. Education Guide Special Stains and H & E. Dako North America. 2thed. California: Carpinteria; 2010. Acesso em 06 Out 2014. Disponível em: http://www.dako.com/08066_special_stains_eduguide.pdf.

Kwak EJ, Vilchez RA, Randhawa P, Shapiro R, Butel JS, Kusne S. Pathogenesis and Management of Polyomavirus Infection in Transplant Recipients. *Clin Infect Dis.* 2002 Nov; 35(9):1081-7.

Lars Jacobsen L, Nielsen M, Månsson S, Rudbeck L. Staining protocol optimization. In: Taylor CR e Rudbeck L. Immunohistochemical Staining Methods Education Guide. 6thed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013. 60-76. [Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf

Lester SC. Manual of Surgical Pathology. 3th ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2010.

Lin F, Chen Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry. Literature review and Geisinger experience. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Dec; 138(12):1564-77.

Lu J, Chang KL. Practical Immunohistochemistry in Hematopathology: A Review of Useful Antibodies for Diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2011 Mar; 18(2):133-51.

Marques, CH. Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial, aplicação terapêutica. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. [Mestrado]. Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular. 2005.

Mason DY, Cordell JL, Brown MH, Borst J, Jones M, Pulford K, et al. CD79a: A Novel Marker for B-Cell Neoplasms in Routinely Processed Tissue Samples. *Blood*; 1995 Aug. 86(4):1453-1459.

Matolcsy A. Immunophenotypic Markers in the Diagnosis of Non-Hodgkin's Lymphomas. Immunophenotypic Analysis. 2ed. Georgetown: Eureka; 2005.

Michalany J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. Com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 3ed. São Paulo: Michalany LTDA; 1998.

Miller RT. Technical immunohistochemistry: Achieving Reliability and Reproducibility of Immunostains. Society for Applied Immunohistochemistry. 2001, Annual Meeting New York Cornell-Queens Hospital Medical Center, Flushing, NY. [Acesso em 06 Fev 2015]. Disponível em: <http://web.bf.uni-lj.si/bi/mikroskopija/pdf/Technical-IHC.pdf>

Montagner JM, Michelon TF, Schroeder RB, Fontanelle BT, Oliveira ATD. Polyomavirus – an emergent pathogen in transplant recipients. *Einstein.* 2007;5(2):184-189.

Moreau A, Le Neel T, Joubert M, Truchaud A, Laboisie C. Approach to automation in immunohistochemistry. *Clin Chim Acta*. 1998 Dec. 278 (2): 177-84.

Musumeci G. Past, present and future: overview on histology and histopathology. *J Histol & Histopathol*. 2014. [Acesso em 03 Fev 2015]. Disponível em: <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2055-091X-1-5.pdf>

Myers J. A review of automated slide stainers for IHC and ISH. *MLO*. 2008 Jan;41-44.

Nakhleh RE. What is quality in surgical pathology? *J Clin Pathol*. 2006 Jul; 59(7): 669–672.

Nielsen S. Selection of the Primary Antibody. In: Taylor, CR, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide*. 6thed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013.46-57. [Acesso em 20 out 2014]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf

Pace GE. Optimization of Immunohistochemical Reactions. In: Taylor CR, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide*. 6thed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company.2013. 102-109.[Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA. Et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000 Aug; 406(6797):747-52.

Petersen K e Hans Christian Pedersen HC. Immunohistochemistry Staining Methods. In: Taylor CR, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide*. 6thed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company.2013. 78-91.[Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em:http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf

Piatol JRM, Pincerato KM, Gomes VCS, Carvalho FM, Pinheiro WS, Baracat EC. Metástase oculta em linfonodo sentinela no câncer de mama em estádios iniciais. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008 Sep; 30(9):432-64.

Pollard K, Lunny D, Holgate CS, Jackson P, Bird OC. Fixation, Processing, and Immunohistochemical Reagent Effects on Preservation of T-Lymphocyte Surface Membrane Antigens in Paraffin-embedded Tissue. *J Histochem Cytochem*. 1987 Nov; 35 (11): 1329-38. [Acesso em 07 Fev 2015]. Disponível em:<http://jhc.sagepub.com/content/35/11/1329.long>

Powell WC, Hicks DG, Prescott N, Tarr SM, Laniauskas S, Williams T et al. A New Rabbit Monoclonal Antibody (4B5) for the Immunohistochemical (IHC) Determination of the HER2 Status in Breast Cancer: Comparison With CB11, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), and Interlaboratory Reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007 Mar; 15(1): 94-102.

Procop GW, Wilson M. Infectious Disease Pathology. *Medical Microbiology*. Clin Infect Dis. 2001Jun. 32(11):1589-1601.

Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42(4): 405–426.

Ramos-Vara, J.A. Diagnosing infectious porcine diseases using immunohistochemistry. *J Swine Health Prod.* 1999; 7(2): 85–91.

Rasmussen OF. Automation in IHC. In: Taylor CR, Rudbeck, L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide*. 6thed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013. 110-119.[Acesso em 20 Jan 2015] Disponível em:http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf

Recondo G, Diaz Canton E, De la Vega M, Greco M, Valsecchi ME. Therapeutic options for HER-2 positive breast cancer: Perspectives and future directions. *World J Clin Oncol.* 2014 Aug; 5(3):440-54

Riera JR. Automation in immunohistochemistry. *Rev Esp Pat Spain.* 1999; 32(3):359-360.

Rocha R, Nunes C, Rocha G, Oliveira F, Sanches F, Gobbi H. Rabbit monoclonal antibodies show higher sensitivity than mouse monoclonals for estrogen and progesterone receptor evaluation in breast cancer by immunohistochemistry. *Pathol Res Pract.* 2008; 204(9): 655-62.

Rosai J, Ackerman's LV. *Surgical Pathology*. 9th ed. Mosby: Edinburgh, 2004.

Saeger W, Lüdecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe HJ, Petersenn S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol.* 2007 Feb; 156(2):203-16.

Sattler A. Automated Staining: Ventana Perspective. In: Lin F, Prichard J, Liu H, Wilkerson M e Schuerch C. *Handbook of practical immunohistochemistry- Frequently asked questions*. New York: Springer Science+Business Media, 2011. [Acesso em 07 Jan 2015].

Disponível

em:https://books.google.com.br/books?id=wR6Y6FhgyRsC&printsec=frontcover&dq=Handbook+of+practical+immunohistochemistry&hl=pt-BR&sa=X&ei=t8atVMLfBsPSeqD7gcgJ&redir_esc=y#v=onepage&q=Handbook%20of%20practical%20immunohistochemistry&f=false

Shi SR, Taylor CR. Antigen Retrieval. In: Taylor CR, Rudbeck L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide*. 6th ed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 2013.30-42.[Acesso em 20 Out 2014]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf

Silva MVC, Reidi R. Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST): C-kit Mutations, CD117 Expression, Differential Diagnosis and Targeted Cancer Therapy with Imatinib. *Pathol Oncol Res.* 2003; 9(1):13-9. Epub 2003 Apr 18.

Sobin LH, Wittekind CH. *TNM classification of malignant tumours*. 6th ed. New York: Willey-Liss; 2002.

Soldini D, Campo E. New insights into the diagnosis of lymphomas. *Ann Oncol* 2012; 23 (10):x83-x88.

Taylor CR, Shi SR, Barr NJ e Wu N. Techniques of Immunohistochemistry: principles, pitfalls and standardization. In: Dabbs, D.J. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 2th ed Philadelphia. Elsevier. 2006.1-27.

Taylor CR. Introduction to Immunohistochemistry In: Taylor, CR, Rudbeck, L. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide*. 6thed. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company.2013.10-17. [Acesso em 20 Jan 2015]. Disponível em: http://www.dako.com/br/08002_ihc_staining_methods.pdf

Titford ME, Horenstein MG, Histomorphologic Assessment of Formalin Substitute Fixatives for Diagnostic Surgical Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2005 Apr; 129(4):502-6.

Thomas MA, Lemmer B. HistoGreen: a new alternative to 3,3V-diaminobenzidine-tetrahydrochloride-dihydrate (DAB) as a peroxidase substrate in immunohistochemistry? *Brain Research Protocols*. 2005; (14):107-118.

Tong CY, Hilton R, MacMahon EM, Brown L, Pantelidis P, Chrystie IL, et al. Monitoring the progress of BK virus associated nephropathy in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Oct; 19(10):2598-05.

Ventana Medical Systems, Inc. Amplification Kit [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 06 Jan 2015] Disponível em:<http://www.ventana.com/product/202?type=201>

Ventana Medical Systems, Inc. BenchMark XT- Ventana® [Internet]. Tucson, Arizona.[Acesso em 10 Dez 2014].Disponível em:http://www.ventana.com/documents/BMK_XT_Spec_sheet_web.pdf

Ventana Medical Systems, Inc. Bluing Reagent Ventana [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 07 Jan 2015] Disponível em: <http://www.ventana.com/product/198?type=195>

Ventana Medical Systems, Inc. Cell conditioning 1 [Internet]. Tucson, Arizona. . [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=cc1&Search.x=0&Search.y=0>

Ventana Medical Systems, Inc. Cell conditioning 2 [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=cc2&Search.x=0&Search.y=0>

Ventana Medical Systems, Inc. CONFIRM™ anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 06 Jan 2015] Disponível em: <http://www.ventana.com/product/114?type=108>

Ventana Medical Systems, Inc. EZ Prep [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=eZ+prep&Search.x=0&Search.y=0>

Ventana Medical Systems, Inc. Hematoxylin II [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 07 Jan 2015] Disponível em: <http://www.ventana.com/product/196?type=2250>

Ventana Medical Systems, Inc. Liquid Coverslip. [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=lcs&Search.x=0&Search.y=0>

Ventana Medical Systems, Inc. Protease 1 [intrenet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 08 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/product/213?type=226>

Ventana Medical Systems, Inc. Protease 2 [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 08 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/product/214?type=229>

Ventana Medical Systems, Inc. Reaction Buffer Concentrate [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=reaction+buffer+concentrate&Search.x=0&Search.y=0>

Ventana Medical Systems, Inc. Silver Wash II [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 11 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/site/search?search-value=silver+wash+II&Search.x=5&Search.y=9>

Ventana Medical Systems, Inc. Sodium Chloride Sodium Citrate buffer [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 10 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/product/1361?type=1733>

Ventana Medical Systems, Inc. UltraView Universal DAB Detection Kit [Internet]. Tucson, Arizona. [Acesso em 11 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.ventana.com/product/1414?type=1791>

Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol* 2012 Sep; 23(10): x207-x210. Acesso em 6 outubro 2014.

Disponível em: <http://annonc.oxfordjournals.org>

Wada N, Aozasa K. Loss of CD20 Expression after Rituximab Therapy for B-Cell Lymphomas: A Review of the Literature. *Cancer and Clinical Oncology* 2012 May; 1(2):1-9.

Waleed S. Mohamed WS, Samra MA, Fawzy MA, Fakhr IM. Lack of Evidence for The Role of BK and JC Polyoma Viruses in Non-Hodgkin's lymphoma Egypt *J Med Microbiol*. 2007 Jul; 16 (3): 455-60.

Werner B, Campos AC, Nadji M, Torres LFB, Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. *J Bras Patol Med Lab* 2005 Out; 41(5): 353-64.

Wick MR. Immunohistochemical approaches to the diagnosis of undifferentiated malignant tumors. *Ann Diagn Pathol*. 2008 Feb; 12(1):72–84.

Wright C, Angus B, Nicholson S, et al. Expression of c-erbB-2 Oncoprotein: A Prognostic Indicator in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 2087-2090.

Zada G, Woodmansee WW, Ramkissoon S, Amadio J, Nose V, Laws ERJ. Atypical pituitary adenomas: incidence, clinical characteristics, and implications. *J Neurosurg*. 2011 Feb; 114(2):336-44.

ANEXO I

Tabela 6. Anticorpos para padronização na Automação com Benchmark XT

Anticorpos	Validade	Clone	Origem	Diluição técnica manual
Actina de músculo liso	jan/13	1A4	DAKO	1:1000
Actina muscular	mai/12	HHF35	DAKO	1:500
Adrenocorticotropina	jul/12	02A3	DAKO	1:3000
ALK	out/12	ALK1	DAKO	1:500
Alpha-1- Fetoproteína	nov/15	Policlonal	DAKO	1:700
Annexina 1	jul/12	Policlonal	Spring Bioscience	1:100
Antígeno carcinoembriônico	mai/13	Policlonal	DAKO	1:25.000
Antígeno comum leucocitário	abr/12	2B11+PD7/26	DAKO	1:1000
Antígeno de membrana epitelial	abr/12	E29	DAKO	1:1000
Antígeno relacionado ao epitélio	mar/11	MOC-31	DAKO	1:3000
Bcl 2 Oncoproteína	set/12	124	DAKO	1:300
Bcl 6	jun/12	PG-B6p	DAKO	1:200
β-Catenina	nov/11	β-catenin-1	DAKO	1:200
BOB 1	fev/13	TG14	NOVOCASTRA	1:200
C4d	out/12	A213	QUIDEL	1:50
CA 125	jun/11	M 11	DAKO	1:200
CA 19-9	jun/11	1116-NS-19-9	DAKO	1:100
Calcitonina	mar/13	CL1948	NOVOCASTRA	1:600
Calrretinina	jun/11	DAK Calret1	DAKO	1:1500
CD 117	dez/11	Policlonal	DAKO	1:300
CD 138	mar/11	MI 15	DAKO	1:900
CD 15	mar/14	BY87	NOVOCASTRA	1:25
CD 19	jul/11	LE-CD 19	DAKO	1:200
CD 1a	jun/11	010	DAKO	1:200
CD 20	fev/12	L 26	DAKO	1:1500
CD 21	fev/15	1 F 8	DAKO	1:200
CD 23	jan/12	MHM6	DAKO	1:300
CD 3	abr/11	F7.2.38	DAKO	1:700
CD 30	out/12	Ber - H2	DAKO	1:600
CD 31	mar/12	JC70A	DAKO	1:200
CD 34	jun/12	QBEnd- 10	DAKO	1:200
CD 38	set/13	SPC32	NOVOCASTRA	1:100
CD 5	ago/11	CD5/54/F6	DAKO	1:500
CD 57	abr/12	TB 01	DAKO	1:200
CD 68	dez/12	PGM1	DAKO	1:700
CD 7	mai/12	CBC.37	DAKO	1:100
CD 79 a	set/11	HM57	DAKO	1:400
CD 8	out/12	C8/144B	DAKO	1:2000

Cont. Tabela 6. Anticorpos para padronização na Automação com Benchmark XT

Anticorpos	Validade	Clone	Origem	Diluição técnica manual
CD10	out/15	NCL-L-CD10-270	NOVOCASTRA	1:50
Célula mesotelial	out/11	HBME-1	DAKO	1:500
CD43	set/11	DF-T1	DAKO	1:500
CD99	dez/11	12-E7	DAKO	1:200
CDX2	jul/12	AMT 28	NOVOCASTRA	1:300
Chromogramina A	abr/12	DAK - A3	DAKO	1:2500
Ciclina D1	jun/11	SP4	DAKO	1:300
Citokeratina 20	jul/12	Ks 20.8	DAKO	1:700
Citokeratina 5/6	nov/12	D5/16B4	DAKO	1:800
Citokeratina 7	jan/12	OV-TL 12/30	DAKO	1:800
Citokeratina 8/18	mar/12	5D3	NOVOCASTRA	1:700
Citokeratina AE1/AE3	out/11	AE1/AE3	DAKO	1:2500
Citokeratina Alto Peso	nov/11	34 β E12	DAKO	1:2000
Citomegalovirus	nov/12	CCH2+DDG9	DAKO	1:2500
Colágeno IV	fev/12	CIV	DAKO	1:50
D2 40	jun/11	D 2 40	DAKO	1:100
Desmina	abr/12	D 33	DAKO	1:400
DOG-1	nov/13	K9	NOVOCASTRA	1:100
E-caderina	abr/12	NCH-38	DAKO	1:400
Enolase neurônio específica	abr/12	BBS/NC/V I-H14	DAKO	1:1000
Epstein-Barr Virus	jun/12	CS.1-4	DAKO	1:1300
Fator 8	mai/12	F8-86	DAKO	1:100
Fosfatase alcalina placentária	fev/12	8A9	DAKO	1:200
FSH	jan/12	C10	DAKO	1:1000
GCDFP	abr/10	23A3	NOVOCASTRA	1:250
GFAP	jun/13	6F2	DAKO	1:700
GH	jun/11	Policlonal	DAKO	1:4000
Glucagon	fev/12	Policlonal	DAKO	1:1000
Gonadotropina coriônica	mai/15	Policlonal	DAKO	1:14.000
Granzime B	out/12	GrB-7	DAKO	1:200
<i>Hepatocyte</i>	mar/13	OCH1E5	DAKO	1:400
HER2	ago/12	SP3	DBS	1:500
HHV8	jul/12	LN 35	AB CAM	1:100
Imunoglobulina A	mar/13	N1CLA	NOVOCASTRA	1:300
Imunoglobulina D	mar/14	DRN1C	NOVOCASTRA	1:1000
Imunoglobulina G	mar/14	RWP49	NOVOCASTRA	1:1000
Imunoglobulina M	nov/13	8H6	NOVOCASTRA	1:800
Inibin a	mar/11	R 1	DAKO	1:300

Cont. Tabela 6. Anticorpos para padronização na Automação com Benchmark XT

Anticorpos	Validade	Clone	Origem	Diluição técnica manual
Insulina	mar/11	Policlonal	DAKO	1:700
Ki67	jan/15	MIB-1	DAKO	1:300
KLC	ago/13	CH15	NOVOCASTRA	1:15.000
LH	dez/11	C93	DAKO	1:400
Lisozima	fev/15	Policlonal	DAKO	1:3000
LLC	jul/13	SHL53	NOVOCASTRA	1:15.000
Mamoglobina	ago/11	304-1A5	DAKO	1:1500
Melan-A	fev/12	A 103	DAKO	1:500
<i>Melanosome</i>	out/11	HMB45	DAKO	1:500
Mieloperoxidase	jul/12	59A5	NOVOCASTRA	1:600
Mioglobina	fev/14	MYO18	NOVOCASTRA	1:1500
MUC 1	nov/10	VU-4-H5	Santa Cruz	1:200
MUC 2	Indisponível	CCP 58	ZYMED	1:500
MUC 4	jun/09	1 G 8	ZYMED	1:200
MUC 5 AC	set/10	45 M 1	ZYMED	1:200
MUM 1	fev/13	mum1 p	DAKO	1:300
Myogenina	dez/11	F5D1	DAKO	1:300
<i>Napsin A</i>	ago/14	01-0221	ARP	1:1500
Oct 2	mar/13	Policlonal	AB CAM	1:500
P53	fev/12	DO-7	DAKO	1:800
P63	ago/14	7JUL	NOVOCASTRA	1:100
Pancitoqueratina	jan/12	MNF 116	DAKO	1:300
PD1	ago/12	NAT	ABCAM	1:200
Polioma Vírus	dez/14	PAb416	CALBIOCHEM	1:1500
Prolactina	mar/12	Policlonal	DAKO	1:2500
Proteína neurofilamento	ago/15	2F11	DAKO	1:200
PSA	fev/12	ER-PR8	DAKO	1:1200
PSMA	mai/12	3 E 6	DAKO	1:900
Racemase	jul/13	EPMU1	NOVOCASTRA	1:400
RCC	ago/10	SPM 314	DAKO	1:1000
Receptor de progesterona	dez/11	PgR636	DAKO	1:700
Receptor de estrógeno	mar/12	SP1	DAKO	1:100
S100	out/14	Policlonal	DAKO	1:3500
Sinaptofisina	fev/13	sy-38	DAKO	1:500
Somatostatina	jul/11	Policlonal	DAKO	1:1200
TDT	abr/13	SEN28	NOVOCASTRA	1:300
TIA1	nov/11	TIA-1	ABCAM	1:300
Tireoglobulina	mar/12	DAK-Tg6	DAKO	1:1000

Cont. Tabela 6. Anticorpos para padronização na Automação com Benchmark XT

Anticorpos	Validade	Clone	Origem	Diluição técnica manual
TSH	mai/11	0042	DAKO	1:800
TTF1	set/14	SPT24	NOVOCASTRA	1:700
Villina	fev/13	CWWB1	NOVOCASTRA	1:600
Vimentina	mar/12	V9	DAKO	1:3000
<i>Wilms' Tumor 1</i>	mai/12	6F-H2	DAKO	1:600
ZAP 70	abr/10	2F3.2	DAKO	1:200

ANEXO II

Tabela 7 Protocolo para Automação Benchmark XT- Ventana

Anticorpos	Clone	RA	Incubação	
			Anticorpo	Diluição
Actina de músculo liso	1A4	60 min CC1	32 min	1:500
Actina muscular	HHF35	60 min CC1	32 min	1:300
Adrenocorticotropina	02A3	Não	32 min	1:1000
ALK	ALK1	60 min CC1	32 min	1:250
Alpha-1- Fetoproteína	Policlonal	Não	32 min	1:50
Annexina 1	Policlonal	90 min CC1	90 min	1:50
Antígeno Carcinoembrionário	Policlonal	60 min CC1	32 min	1:1000
Antígeno de membrana epitelial	E29	60 min CC1	32 min	1:100
Antígeno relacionado ao epitélio	MOC-31	90 min CC1	90 min	1:50*
Bcl 2 Oncoproteína	124	90 min CC1	90 min	1:25*
Bcl 6	PG-B6p	90 min CC1	90 min	1:50*
Beta-Catenina	β -catenin-1	60 min CC1	32 min	1:100
BOB 1	TG14	90 min CC1	90 min	1:25*
C4d	A213	60 min CC1	32 min	1:10
CA 125	M 11	60 min CC1	32 min	1:50
CA 19-9	1116-NS-19-9	90 min CC1	32 min	1:50
Calcitonina	CL1948	4 min Protease 1	32 min	1:300
Calretinina	DAK Calret1	90 min CC1	90 min	1:25*
CD 1a	010	60 min CC1	32 min	1:100
CD 3	F7.2.38	60 min CC1	32 min	1:350
CD 5	CD5/54/F6	60 min CC1	32 min	1:250
CD 7	CBC.37	60 min CC1	32 min	1:50
CD 8	C8/144B	60 min CC1	32 min	1:1000
CD 10	56C6	60 min CC1	32 min	1:20
CD 15	BY87	84 min CC2	60 min	1:25
CD 19	LE-CD 19	60 min CC1	32 min	1:100
CD 20	L 26	60 min CC1	32 min	1:500
CD 21	1 F 8	4 min Protease 1	60 min	1:25*
CD 23	MHM6	60 min CC1	32 min	1:150
CD 30	Ber - H2	90 min CC1	60 min	1:30
CD 31	JC70A	60 min CC1	32 min	1:100
CD 34	QBEnd- 10	90 min CC1	32 min	1:100
CD 38	SPC32	60 min CC1	32 min	1:400
CD 43	DF-T1	60 min CC1	32 min	1:300
CD 57	TB 01	60 min CC1	32 min	1:100
CD 68	PGM1	60 min CC1	32 min	1:300
CD 79	HM57	60 min CC1	32 min	1:200
CD 99	12-E7	60 min CC1	32 min	1:100
CD 117	Policlonal	Não	32 min	1:100

* Necessário uso de amplificador; RA: Recuperação antigênica

Cont. Tabela 7 Protocolo para Automação Benchmark XT- Ventana

Anticorpos	Clone	RA	Incubação	
			Anticorpo	Diluição
CD 138	MI 15	90 min CC1	90 min	1:100
CDX2	AMT 28	90 min CC1	90 min	1:25*
Célula mesotelial	HBME-1	90 min CC1	32 min	1:100
c-erbB-2	SP3	60 min CC1	32 min	1:500
CICLINA	SP4	60 min CC1	32 min	1:150
Citomegalovirus	CCH2+DDG9	4 min Protease 1	32 min	1:800
Citoqueratina AE1/AE3	AE1/AE3	60 min CC1	32 min	1:1000
Citoqueratina de Alto Peso	34βE12	60 min CC1	32 min	1:500
Citoqueratina 5/6	D5/16B4	60 min CC1	32 min	1:200
Citoqueratina 5,6,8,17,19	MNF 116	60 min CC1	32 min	1:100.
Citoqueratina 7	OV-TL 12/30	60 min CC1	32 min	1:400
Citoqueratina 8/18	5D3	60 min CC1	32 min	1:350
Citoqueratina 20	Ks 20.8	60 min CC1	32 min	1:350
Colageno IV	CIV	90 min CC1	32 min	1:100
Cromogranina	DAK - A3	60 min CC1	32 min	1:250
Desmina	D 33	60 min CC1	32 min	1:150
DOG-1	K9	90 min CC1	32 min	1:100
E-caderina	NCH-38	60 min CC1	32 min	1:150
Enolase neurônio específica	BBS/NC/V I-H14	60 min CC1	32 min	1:500
Epstein-Barr Virus	CS.1-4	60 min CC1	32 min	1:600
Fator VIII	F8-86	4 min Protease 1	32 min	1:50
FSH	C10	4 min Protease 1	32 min	1:100
GCDFP	23A3	60 min CC1	32 min	1:400
GFAP	6F2	60 min CC1	32 min	1:500
GH	Policlonal	Não	32 min	1:3000
Glucagon	Policlonal	Não	32 min	1:200
Gonadotropina Coriônica	Policlonal	60 min CC1	32 min	1:4000
Granzime B	GrB-7	90 min CC1	90 min	1:50
Hepatocito	OCH1E5	60 min CC1	32 min	1:300
HHV8	LN 35	60 min CC1	90 min	1:50*
Imunoglobulina A	N1CLA.	60 min CC1	32 min	1:200
Imunoglobulina D	DRN1C	60 min CC1	32 min	1:50
Imunoglobulina G	RWP49	60 min CC1	32 min	1:1000
Imunoglobulina M	8H6	60 min CC1	32 min	1:400
Inibina	R 1	90 min CC1	32 min	1:50
Insulina	Policlonal	Não	32 min	1:300
Ki-67	MIB-1	60 min CC1	32 min	1:50
KLC	CH15	60 min CC1	32 min	1:2000
LCA	2B11+PD7/26.	60 min CC1	32 min	1:500
LH	C93	60 min CC1	32 min	1:200

* Necessário uso de amplificador; RA: Recuperação Antigênica

Cont. Tabela 7 Protocolo para Automação Benchmark XT- Ventana

Anticorpos	Clone	RA	Incubação Anticorpo	Diluição
Lisozima	Policlonal	Não	60 min	1:500
LLC	SHL53	60 min CC1	32 min	1:2000
Mamoglobina	304-1A5	60 min CC1	32 min	1:300
Melan-A	A 103	60 min CC1	32 min	1:100
Melanosome	HMB45	60 min CC1	32 min	1:300
Mieloperoxidase	59A5	60 min CC1	32 min	1:300
Miogenina	F5D1	60 min CC1	32 min	1:100
Mioglobina	MYO18	60 min CC1	60 min	1:400
MUC 1	VU-4-H5	60 min CC1	32 min	1:50
MUC 2	CCP 58	60 min CC1	32 min	1:200
MUC 4	1 G 8	60 min CC1	32 min	1:50
MUC 5 AC	45 M 1	60 min CC1	32 min	1:50
MUM 1	mum1 p	60 min CC1	32 min	1:100
Napsina	TMU-Ad02	60 min CC1	32 min	1:500
Oct 2	Policlonal	90 min CC1	90 min	1:50*
P53	DO-7	60 min CC1	32 min	1:200
P63	7JUL	60 min CC1	32 min	1:50
PD1	NAT	60 min CC1	32 min	1:50
PLAP	8A9	60 min CC1	32 min	1:100
Podoplanina	D 2 40	90 min CC1	32 min	1:25
Polioma Vírus	PAb416	60 min CC1	32 min	1:500
Prolactina	Policlonal	Não	32 min	1:1250
Proteína neurofilamento	2F11	60 min CC1	32 min	1:50
PSA	ER-PR8	Não	32 min	1:100
PSMA	3 E 6	90 min CC1	90 min	1:200
Racemase	EPMU1	60 min CC1	32 min	1:100
RCC	SPM 314	60 min CC1	32 min	1:500
RP	SP1	90 min CC1	32 min	1:50
RP	PgR636	90 min CC1	90 min	1:100*
S100	Policlonal	60 min CC1	32 min	1:2000
Sinaptofisina	sy-38	90 min CC1	90 min	1:50*
Somatostatina	Policlonal	Não	32 min	1:400
TDT	SEN28	60 min CC1	32 min	1:200
TIA1	TIA-1	60 min CC1	32 min	1:100
Tireoglobulina	DAK-Tg6	Não	32 min	1:500
TSH	0042	60 min CC1	32 min	1:400
TTF1	SPT24	60 min CC1	32 min	1:600
Villina	CWWB1	60 min CC1	32 min	1:300
Vimentina	V9	60 min CC1	32 min	1:2000
WT1	6F-H2	8 min Protease 1	90 min	1:50
ZAP 70	2F3.2	90 min CC1	32 min	1:50

* Necessário uso de amplificador; RA: Recuperação antigênica

ANEXO III

1 METODOLOGIA

1.1 Critério de inclusão

Foram incluídos neste estudo anticorpos concentrados que o Laboratório de Patologia do Complexo hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre estivesse usando na rotina de Imuno-histoquímica manual e que tivessem sido utilizados pelo menos uma vez por semana em todos os meses do ano de 2012.

1.2 Encaminhamento ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

O projeto foi encaminhado ao CEP pela Plataforma Brasil, para a apreciação quanto aos aspectos éticos relevantes para a realização do estudo.

1.3 Seleção das amostras de tecido para os testes

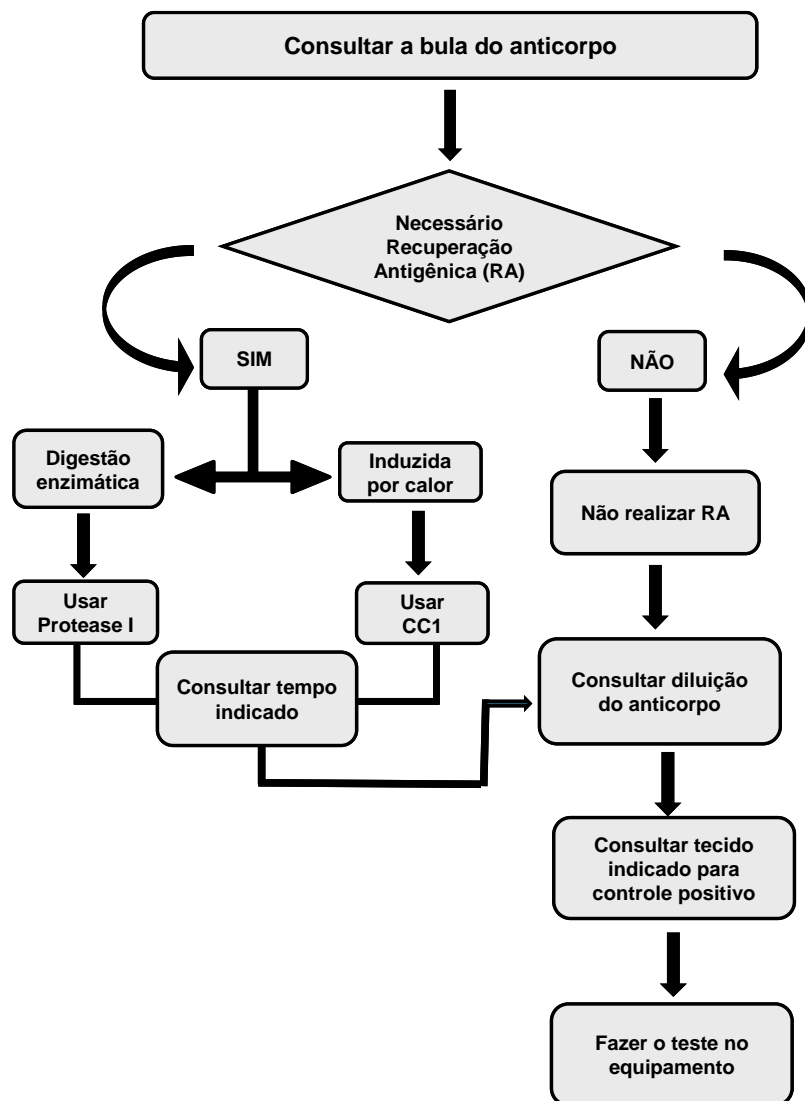
As amostras foram selecionadas de acordo com a indicação de controle positivo do fabricante do anticorpo na bula do anticorpo. As peças cirúrgicas ou biópsias selecionadas devem ter sido encaminhadas para exame anátomo-patológico no laboratório no período entre janeiro de 2012 a janeiro de 2013. Estas amostras devem ter sido fixadas em formol 10% tamponado, conter a proteína contra a qual o anticorpo será testado e devem ter sido interpretadas como positivas em reação imuno-histoquímica manual.

1.4 Obtenção das lâminas para a padronização

Foram obtidas para a padronização de cada anticorpo em teste, por meio de corte histológico em micrótomo regulado na espessura de 3 μm , 5 lâminas do tipo *Starfrost*, próprias para a automação, com o tecido que contenha o antígeno de interesse.

1.5 Definição do protocolo

Foi realizada uma consulta a bula de todos os anticorpos padronizados para verificar e seguir a indicação do fabricante quanto a diluição recomendada, o tempo de incubação no anticorpo, o tipo de recuperação antigênica, o tempo na recuperação antigênica. Após a consulta a bula foi seguido o algoritmo abaixo para a criação dos protocolos.



1.6 Criação do protocolo no *software*

Consultando o manual do equipamento foi criado o protocolo para a corrida de titulação, incluindo a definição dos parâmetros apresentados a seguir:

- Será definido o tempo de incubação dos anticorpos;
- Será definido o tipo de recuperação antigênica das amostras;
- Será definido o tempo de recuperação antigênica das amostras.

Após a criação do protocolo, será necessário carregar o equipamento com os reagentes da Ventana® como o Kit de detecção *ultraView Universal DAB Detection Kit* (Ref. 760-500), *Hematoxilin II* (Ref. 790-2208), *Bluing* (ref. 760-2037), *EZ Prep*, (Ref. 950-102), *Liquid Coverslip* (Ref. 650-010) *Reaction Buffer* (Ref. 950-300), *Cell conditioning 1- CC1* (Ref. 950-124) e *Cell conditioning 2 -CC2* (Ref. 950-123).

1.7 Diluição dos anticorpos para a padronização

A diluição inicial dos anticorpos para o teste será aquela recomendada pelo fabricante do anticorpo e realizada com *Antibody Diluent* (Ventana) através da utilização de micropipetas da marca Pipetmann Gilson P2 (0,2- 2 µl), P20 (2-20 µl) P200 (50-200 µl) ou P1000 (200-1000 µl).

1.8 Executar a corrida de teste para os anticorpos

Será impressa a etiqueta de teste do protocolo e colada na lâmina histológica que contém as amostras de tecido para o teste. Esta lâmina será devidamente posicionada na bandeja de incubação do equipamento e o *software* será acionando dando início a execução do protocolo. Durante a corrida de titulação, haverá um momento para incubação do anticorpo, que será pipetado manualmente em cima da lâmina (Fig 5). Ao término da corrida, as lâminas serão desidratadas, montadas, e encaminhadas para a análise da coloração na microscopia de luz por um patologista.

ANEXO IV

Tabela 8. Tecidos para padronização dos protocolos e anticorpos

PACIENTE	TECIDO	DIAGNÓSTICO	ANTICORPO			
1	Placenta	Normal	PLAP			
			Anexina			
			CD 31			
			CD 34			
			HCG			
			FVIII			
			ACTH			
			FHS			
			GH			
			LH			
2	Hipófise	Normal	Prolactina			
			TSH			
			Betacatenina			
			Ck 7			
			Ck8/18			
			E-caderina			
			EMA			
			MOC31			
			GCDFP15			
			Mamoglobina			
3	Mama	Normal	Ck APM			
			Ck AE1/AE3			
			Ck Pan			
			Ck5/6			
4	Pele	Normal	Ck 20			
			Ca19.9			
			CEA			
			CDx2			
			Muc1			
			Muc2			
			Muc4			
			Muc5			
			viliin			
			Dog1			
5	Intestino	Normal	CD117			
			CD3, CD5			
			CD7, CD8			
			CD10			
			Bcl2			
			Bcl6			
			Zap70			
			CD19, CD20			
			CD21, CD23			
			CD43			
6	Estômago	Gist	CD79a			
			LCA			
			Granzime B			
			Tia 1			
			Oct2			
			7	Linfonodo	Hiperplasia	Oct2

Cont. Tabela 8. Tecidos para padronização dos protocolos e anticorpos

PACIENTE	TECIDO	DIAGNÓSTICO	ANTICORPO
			Mum1
			BOB1
			Imunoglobulina A
			Imunoglobulina D
			Imunoglobulina M
			Imunoglobulina G
			Ki67
			Lisozima
			Myeloperoxidase
8	Amígdala	Hiperplasia	Pd1
			CD99
9	Timo	Normal	CD1A
			CD15
10	Linfonodo	Linfoma de Hodgkin	CD30
11	Pulmão	Normal	CD68
			Colágeno
12	Rim	Normal	C4d
13	Músculo	Normal	Mioglobina
14	Linfonodo	Linfoma do Manto	Cyclin D1
			CD138
			CD 38
			KLC
15	Linfonodo	Plasmocitoma	LLC
16	Linfonodo	Linfoma anaplásico	Alk 1
			Melan-A
17	Pele	Melanoma	Melanosome
18	Linfonodo	Linfoma linfoblástico	TDT
19			C-erbB-b2
20			P53
21			RE
22	Mama	Carcinoma de mama	RP
23			Cromogranina
			Enolase neuro-específica
			Sinaptofisinas
	Pâncreas	Carcinoma Neuroendócrino	CD57
			Proteína S100
			Neurofilamento
24	Nervo	Normal	GFAP
			Alpha-1-fetoproteína
25	Fígado	Normal	Hepatocyte
26	Pulmão	Infecção por CMV	CMV
27	Linfonodo	Infecção por E BV	EBV

Cont. Tabela 8. Tecidos para padronização dos protocolos e anticorpos

PACIENTE	TECIDO	DIAGNÓSTICO	ANTICORPO
28	Rim	Polioma vírus	Polioma vírus
29	Sarcoma de Kaposi	Infecção por Herpes virus 8	Hhv8 Actina de músculo liso Actina muscular Desmina
30	Apêndice	Normal	Vimentina
31	Membro inferior	Rabdomiossarcoma	Miogenina
32	Ovário	Adenocarcinoma seroso	Ca125
33	Tireóide	Carcinoma medular de tireóide	Calcitonina
34	Adrenal	Normal	Inibin a Insulina Glucagon
35	Pâncreas	Normal	Somatostatina Calretinina Célula mesotelial
36	Pleura	Mesotelioma	Podoplanina PSA PSMA P63
37	Próstata	Normal	Racemase
38	Rim	Carcinoma renal	RCC TTF1
39	Tireóide	-	Tireoglobulina
40	Ovário	Adenocarcinoma seroso pailífero	WT1
41	Pulmão	Adenocarcinoma	Napsina

ACTH: Adrenocorticotropina, CEA: Antígeno carcinoembrionário, CkAPM: Citoqueratina alto peso molecular

CMV: Citomegalovírus, EBV: Epstein Barr virus, EMA: Antígeno epitelial de membrana

FSH: Hormônio folículo-estimulante, HCG: Gonadotropina coriônica, KLC: Kappa Light chains

LH: Hormônio luteinizante, LLC: Lambda light chains, MOC31: Antígeno relacionado ao epitélio

PLAP: Fosfatase alcalina placentária, PSA: Antígeno específico da próstata

PSMA: Antígeno da membrana específica da próstata, RE: Receptor de estrógeno

RP: Receptor de progesterona, TSH: Hormônio tireoestimulante, TTF1: Fator de transcrição da tireóide

ANEXO V

Tabela 7. Grupos de marcadores Imuno-histoquímicos

Marcadores Adenoma hipofisário	ACTH, FSH, LH, TSH, GH, Prolactina.
Marcadores de Carcinoma	CA125,CEA, GCDFP15, Her2,Ki67, Inibin a, Mamoglobina,Napsina, P53, P63, RE, RP, RCC,TTF1,Tireoglobulina.
Marcadores de células musculares	Actina muscular, Actina músculo liso, Desmina, Miogenina, Mioglobina.
Marcadores endoteliais	CD31,CD34, FVIII.
Marcadores epiteliais	Beta-catenina, Ck5/6, Ck7, Ck8/18, Ck20, Ck APM, Ck5,6,8,17 e19, Ck AE1/AE3,EMA,MOC-31,E-caderina,Muc1,Muc2,Muc4,Muc5.
Marcadores histiocitários	Anexina, CD68, Lisozima, Mieloperoxidase.
Marcadores gastrointestinais	CA19.9,CDX2, CD117, DOG1, Vilina.
Marcadores de Melanoma	Melan-a, Melanosome, S100.
Marcadores células B	BCL2,BCL6, BOB1,CD10,CD20,CD19,CD21, CD23,CD38,CD79,CD138,MUM1.
Marcadores células T	CD1A, CD3,CD5,CD7,CD8,GranzimeB, PD1, TIA1.
Marcadores de Linfoma	ALK1,CD15,CD30,CD43, Ciclina D1, KLC,LLC, LCA, IgA, IgD, IgG, IgM, OCT2,TdT, ZAP70.
Marcadores de Mesotelioma	Calretinina, Célula mesotelial.
Marcadores neuroendócrinos	CD57,Cromogranina,Enolase neurônio específica, GFAP, Glucagon, Insulina, Sinaptofisina, Somatostatina, Neurofilamento.
Marcadores de próstata	PSA, PSMA, Racemase
Marcadores virais	CMV, EBV, Polioma, HHV8
Marcadores de células germinativas	Alfa-feto proteína, PLAP, HCG
Outros	C4d, Calcitonina, CD99,Colágeno IV, Hepatocyte,Napsina, Podoplanina,Vimenina, WT1

ACTH: Adrenocorticotropina, CEA: Antígeno carcinoembrionário, CkAPM: Citoqueratina alto peso molecular

CMV: Citomegalovírus, EBV: Epstein Barr virus, EMA: Antígeno epitelial de membrana,FSH: Hormônio folículo-estimulante

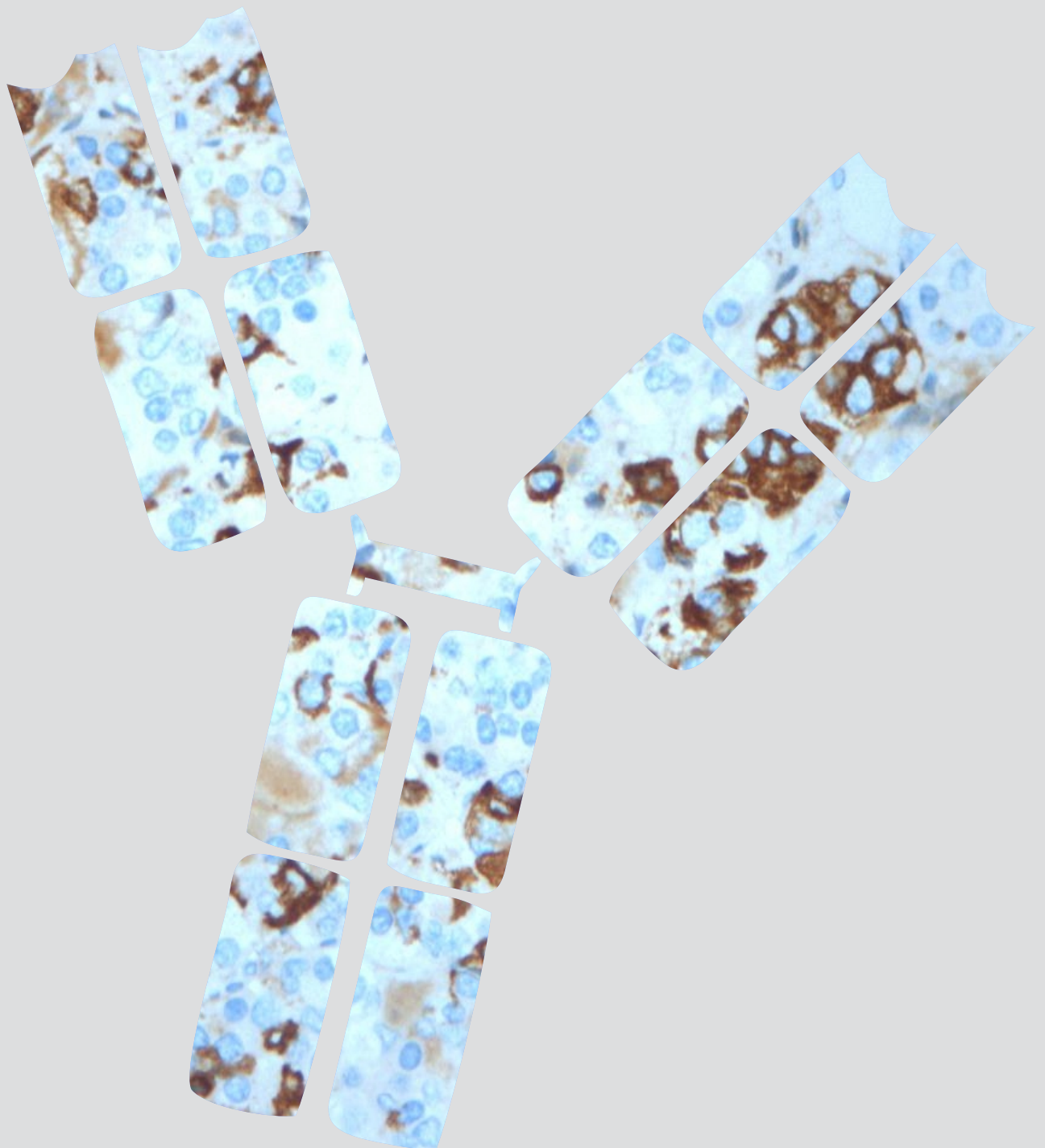
HCG: Gonadotropina coriônica, KLC: Kappa Light chains,LH: Hormônio luteinizante,LLC: Lambda light chains

MOC31: Antígeno relacionado ao epitélio, PLAP: Fosfatase alcalina placentária,PSA: Antígeno específico da próstata

PSMA: Antígeno da membrana específica da próstata, RE: Receptor de estrógeno

RP: Receptor de progesterona,TSH: Hormônio tireoestimulante,TTF1: Fator de transcrição da tireóide

Marcadores Adenoma Hipofisário



Adrenocorticotropina (ACTH)

Clone: 02A3, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: produto das células adeno-hipofisárias corticotróficas. Útil na classificação de adenomas deste tipo celular.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.



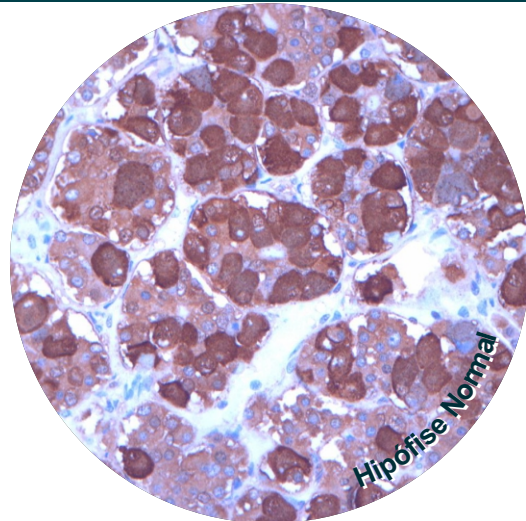
**Protocolo
Recuperação**

Antigênica: Não necessário
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 1000



Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

Clone: C10, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: produto das células adeno-hipofisárias gonadotróficas. Útil na classificação de adenomas deste tipo celular.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.



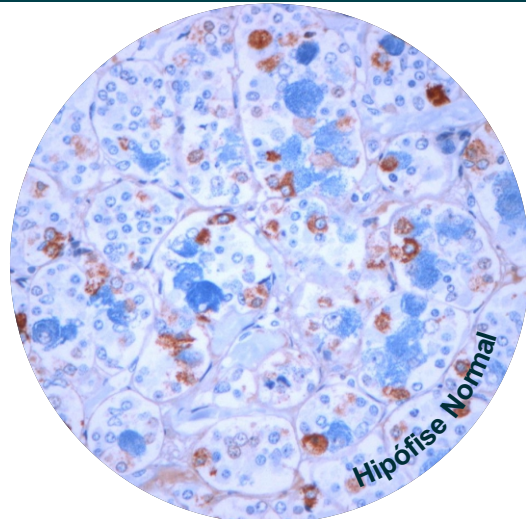
**Protocolo
Recuperação**

Antigênica: 4 min Protease I
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:100



Hormônio do Crescimento (GH)

Clone: Policlonal, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: produto das células adeno-hipofisárias somatotróficas. Útil na classificação de adenomas deste tipo celular.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.



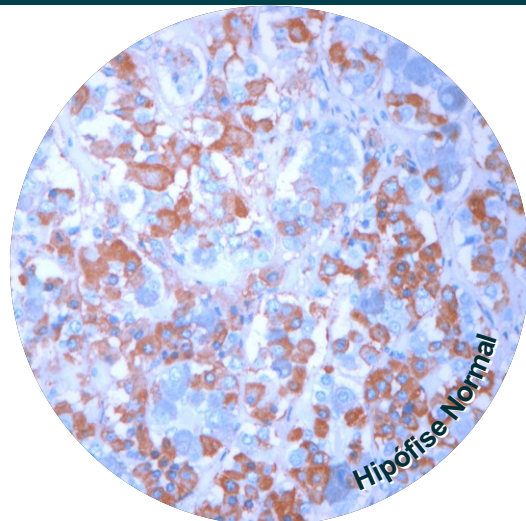
**Protocolo
Recuperação**

Antigênica: Não necessário
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 3000



*CC1: Cell conditioning 1


Hormônio Luteinizante (LH)

Clone: C93, Dako

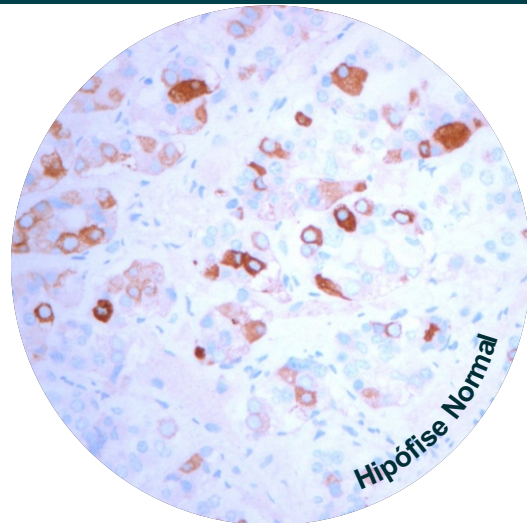
Localização: Citoplasma

Descrição: produto das células adeno-hipofisárias gonatotróficas. Útil na classificação de adenomas deste tipo celular.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 200




Prolactina


Clone: Policlonal, Dako

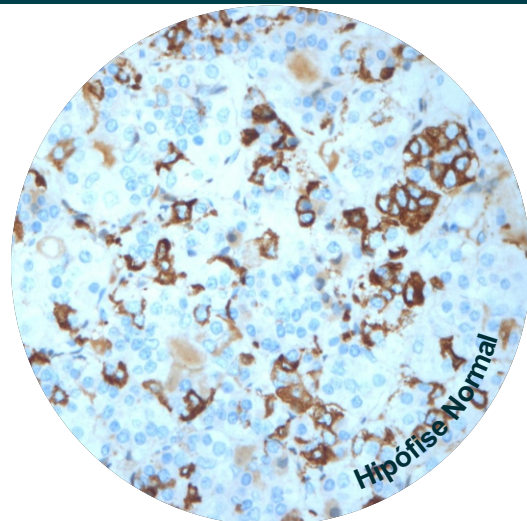
Localização: Citoplasma

Descrição: produto das células adeno-hipofisárias lactotróficas. Útil na classificação de adenomas deste tipo celular.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** Não necessário
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 1250




Hormônio Tireotrófico (TSH)


Clone: 0042, Dako

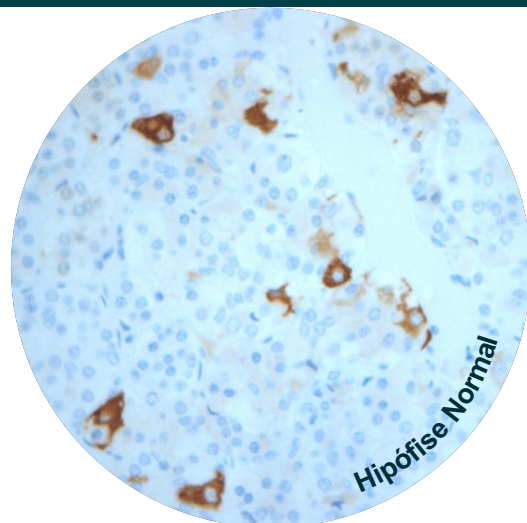
Localização: Citoplasma

Descrição: produto das células adeno-hipofisárias tireotróficas. Útil na classificação de adenomas deste tipo celular.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

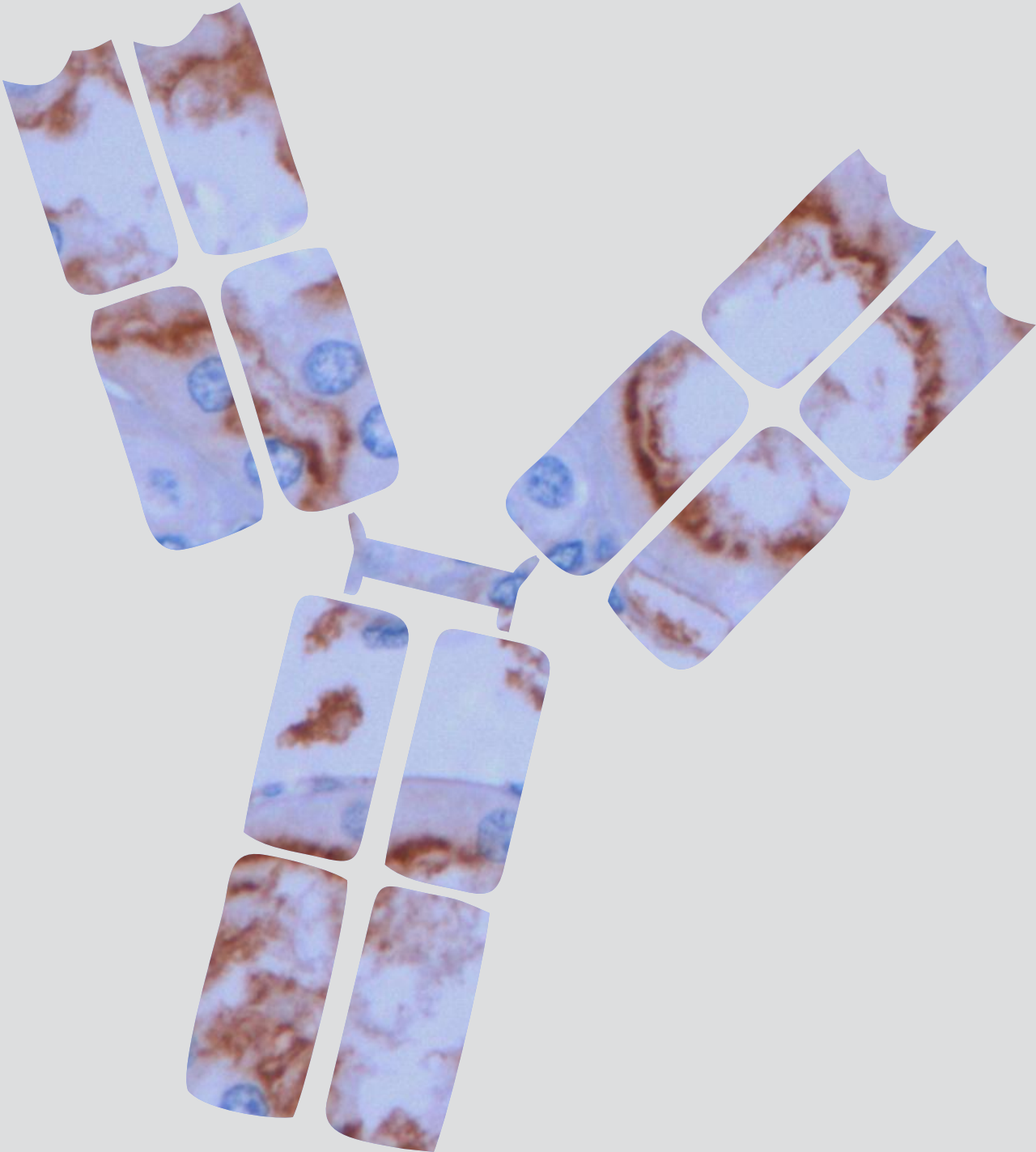
Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 400



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores de Carcinoma



Antígeno de Câncer Ovariano (Ca125)

Clone: M11, Dako

Localização: Membrana

Descrição: positivo na maioria dos carcinomas de ovário, frequentemente positivo em outros carcinomas ginecológicos.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

**Protocolo
Recuperação**



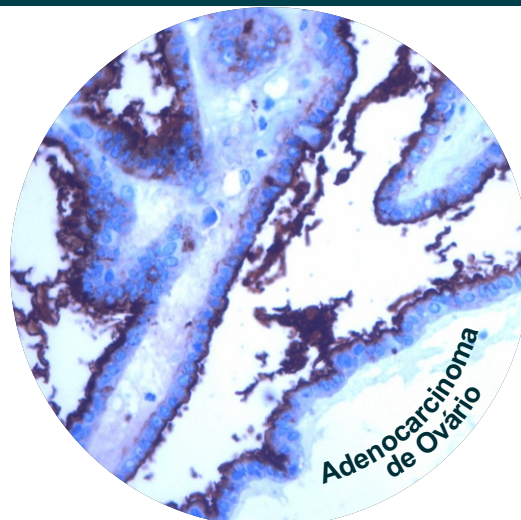
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 50



Antígeno Carcinoembrionário (CEA)

Clone: Policlonal, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: marcador epitelial originalmente descrito no sistema digestivo, é praticamente ausente em tumores não epiteliais, portanto útil na pesquisa de sítio primário de carcinomas. Adenocarcinomas primários do trato gastro-intestinal apresentam intensa expressão.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

**Protocolo
Recuperação**



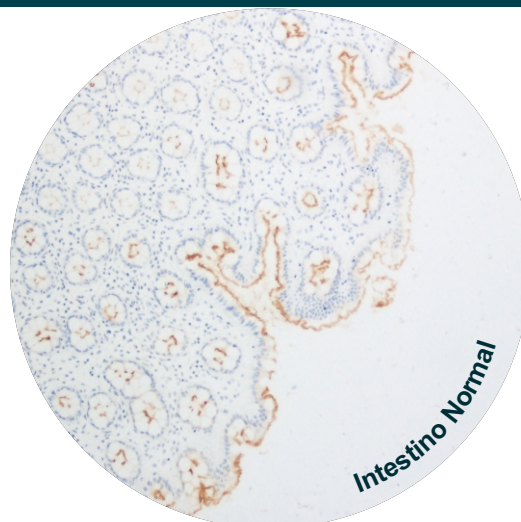
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:1000



Fluído Proteico de Doença Cística (GCDFP-15)

Clone: 23A3, Novocastra

Localização: Citoplasma

Descrição: Um grande número de carcinomas primários e metastáticos da mama expressam este antígeno. Sua positividade é um forte indicador de origem mamária em um carcinoma de origem desconhecida.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

**Protocolo
Recuperação**



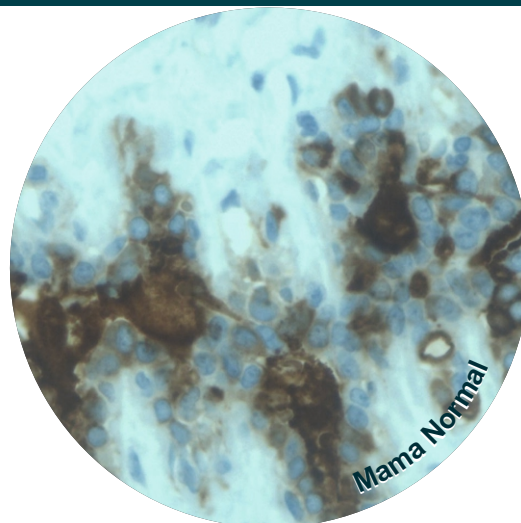
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:400



*CC1: Cell conditioning 1

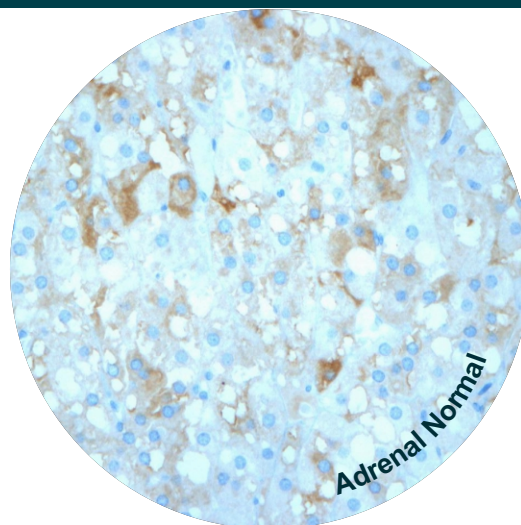
Inibina Alfa

Clone: R1, Dako
Localização: Citoplasma
Descrição: hormônio peptídico produzido pelo ovário para inibir o Hormônio folículo estimulante.

Rosai J, Ackerman's Surgical Pathology LV.. 9th ed. Mosby: Edinburgh, 2004

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 90 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 50



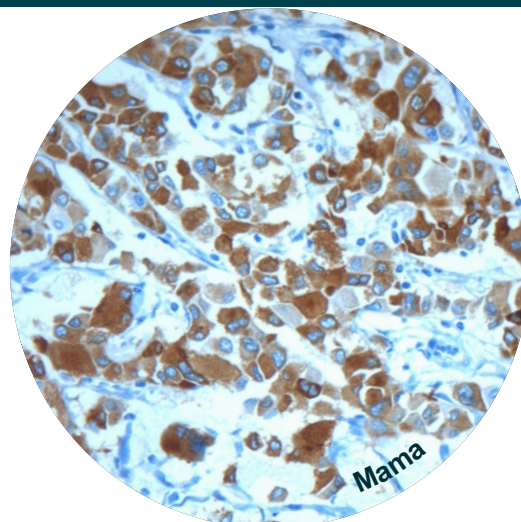
Mamoglobina

Clone: 304-1A5, Dako
Localização: Citoplasma
Descrição: é superexpressa em adenocarcinoma de mama, parece ser mais sensível do que GCDPF-15 mas não é específico para carcinoma de mama.

Bahrami A, Truong LD, Ro JY. Undifferentiated tumor true identity by immunohistochemistry. Arch Pathol Lab Med 2008 Mar;132:326-348.

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:300



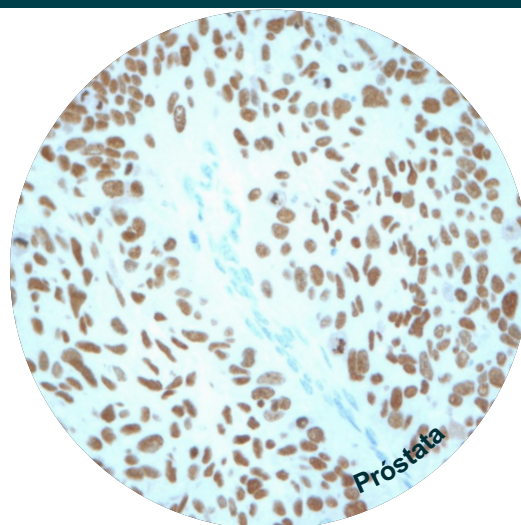
P63

Clone: 7JUL, Novocastra
Localização: Núcleo
Descrição: membro da família da p53 é essencial para diferenciação do epitélio escamoso estratificado.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins e Cotran. Patologia bases patológicas das doenças. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:50



*CC1: Cell conditioning 1

Carcinoma de Células Renais (RCC)

Clone: SPM314, Dako

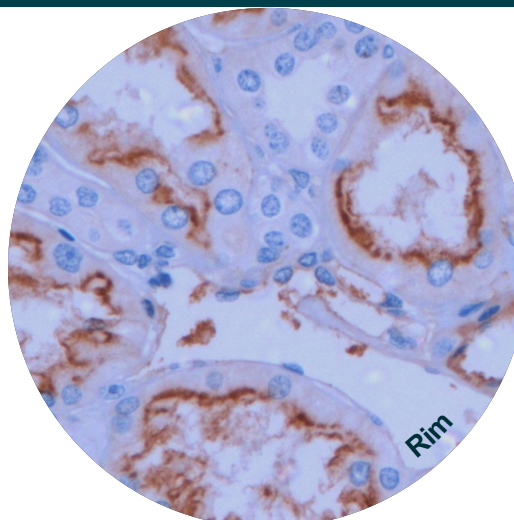
Localização: Citoplasma

Descrição: marcador útil para classificação de carcinomas de origem renal. O anticorpo reconhece o antígeno da borda em escova das células renais tubulares proximais.

Shen SS, Truong LD, Scarpelli M, Beltran AL. Role of Immunohistochemistry in Diagnosing Renal Neoplasms When Is It Really Useful? Arch Pathol Lab Med—2012 Apr; 136:410-417.

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 500



Tireoglobulina

Clone: DAK-Tg6, Dako

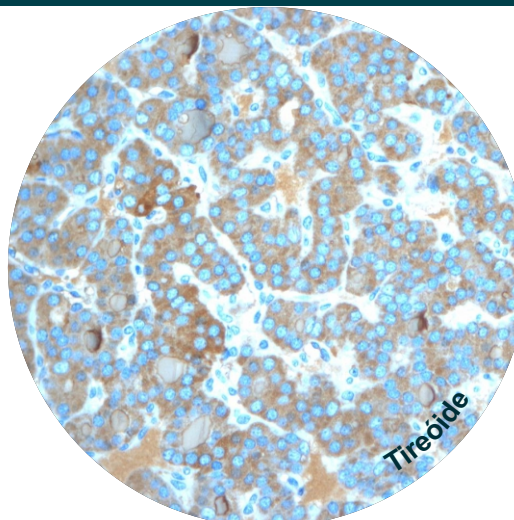
Localização: Citoplasma

Descrição: sintetizada pela tireóide, apresenta alta sensibilidade para carcinomas primários e metastáticos da tireóide.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
Antigênica: Não necessário
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:500



Fator de Transcrição da Tireóide (TTF1)

Clone: SPT24, Novocastra

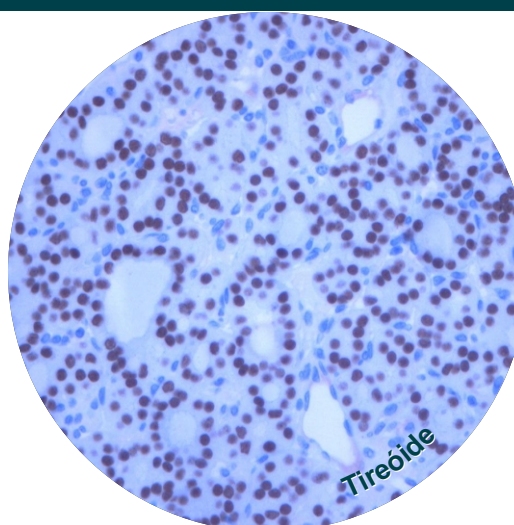
Localização: Núcleo

Descrição: proteína reguladora de transcrição, apresenta alta sensibilidade para carcinomas da tireóide e alta especificidade para carcinoma de pulmão.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrigs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 60min CC1
Incubação anticorpo: 32min

Diluição
 1: 600



*CC1: Cell conditioning 1

c-erbB-2

Clone: SP3, DBS

Localização: Membrana

Descrição: proteína transmembrana, cuja expressão está relacionada a maior agressividade biológica nos tumores. A expressão na membrana está relacionada com a amplificação do gene.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrigs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.



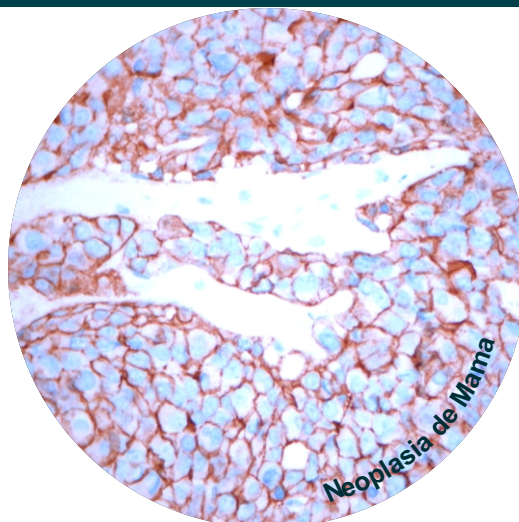
**Protocolo
Recuperação**

Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 500



Ki67

Clone: MIB-1, Dako

Localização: Núcleo

Descrição: marcador de uma proteína presente nas fases do ciclo celular, exceto em G0, apresentando relação com a fração de crescimento de uma população celular.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.



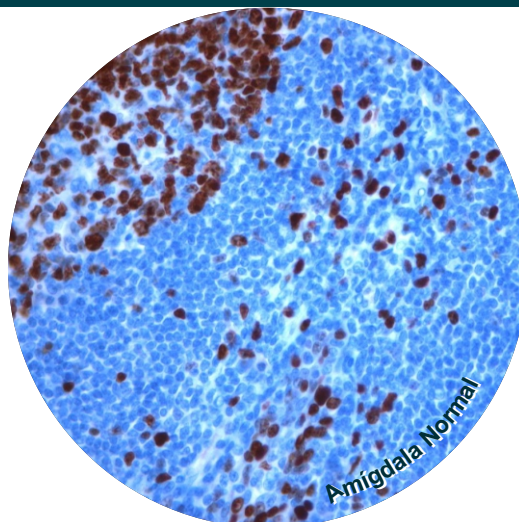
**Protocolo
Recuperação**

Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 50



P53

Clone: DO-7, Dako

Localização: Núcleo

Descrição: gene que codifica uma fosfoproteína nuclear que atua na proliferação celular regulando a transcrição do DNA. A inativação de P53 por mutação ou deleção é frequentemente encontrada em neoplasias humanas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.



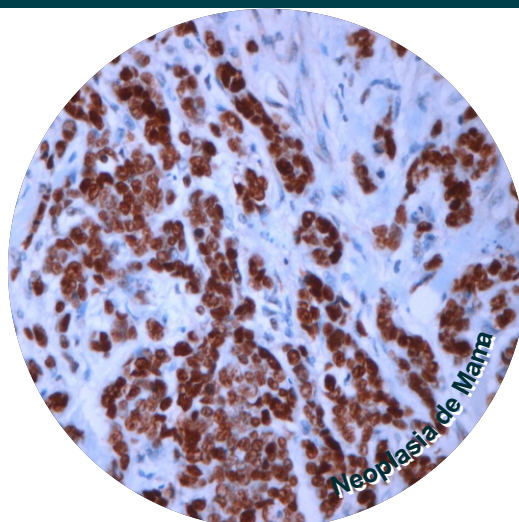
**Protocolo
Recuperação**

Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:200



*CC1: Cell conditioning 1

Receptor de Estrógeno (RE)

Clone: SP1, Dako

Localização: Núcleo

Descrição: Reage com a proteína receptor de estrógeno, presente em maior concentração no núcleo das células epiteliais mamárias e endometriais.

4. Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo

Recuperação

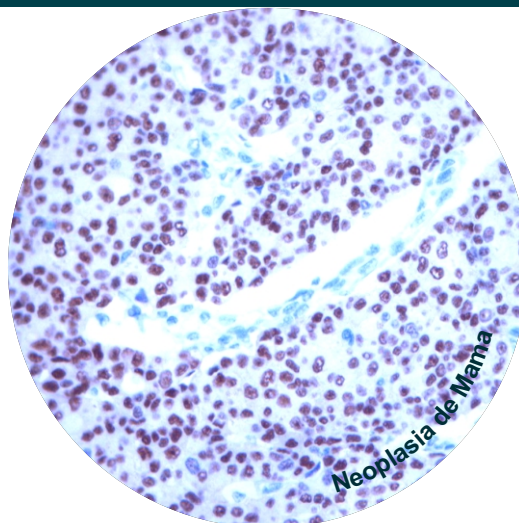
Antigênica: 90 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 50



Receptor de Progesterona (RP)

Clone: PgR636, Dako

Localização: Núcleo

Descrição: O receptor hormonal de progesterona é uma das proteínas nucleares que representa um fator preditivo à resposta terapêutica. A presença de receptores de estrógeno e progesterona é excelente marcador de diferenciação dos carcinomas mamários.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo

Recuperação

Antigênica: 90 min CC1

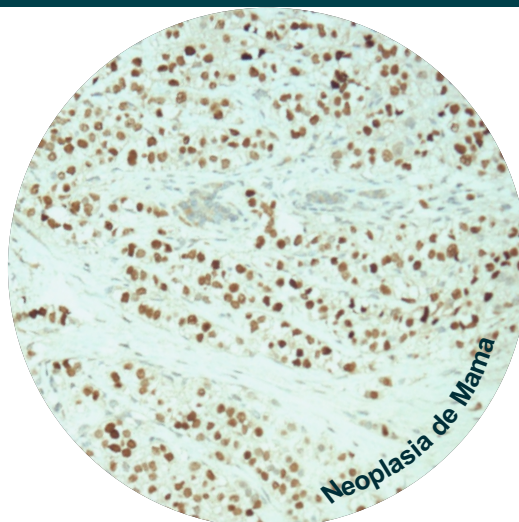
Incubação anticorpo: 90 min

*Uso de amplificador



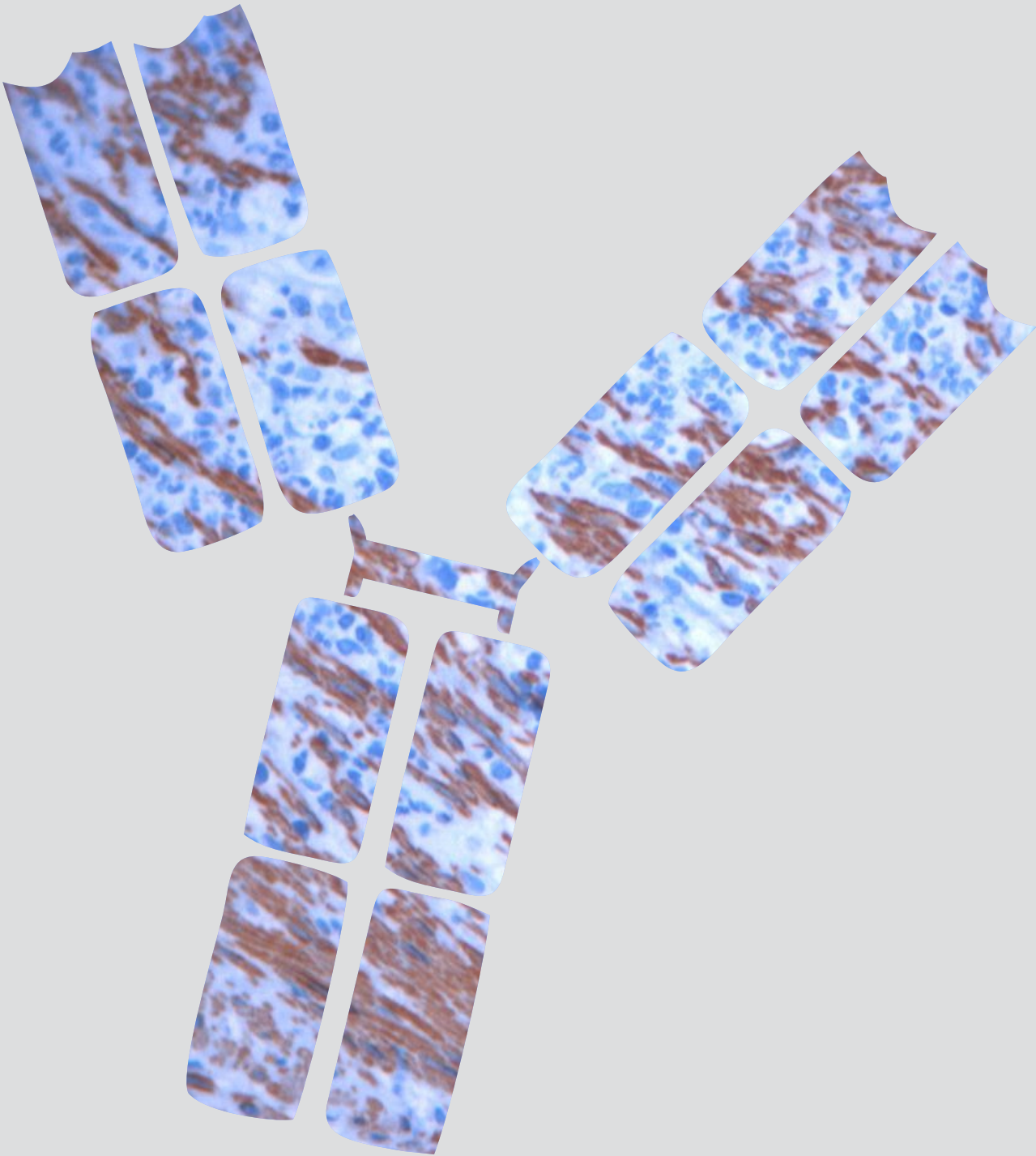
Diluição

1: 100*



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores de Células Musculares




Actina de músculo liso (α -SMA)

Clone: 1A4, Dako

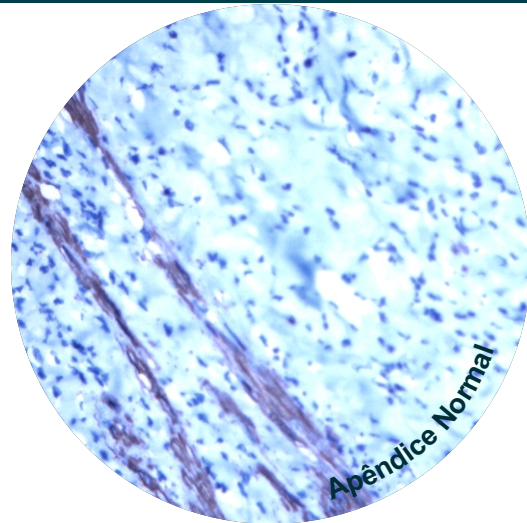
Localização: Citoplasma

Descrição: reage com o isotipo alfa da actina de músculo liso. Util para indicar a diferenciação muscular lisa em tumores.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 500




Desmina


Clone: D 33, Dako

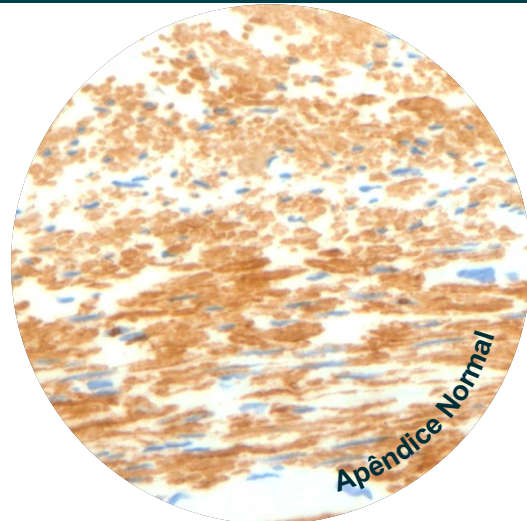
Localização: Citoplasma

Descrição: filamento intermediário de células musculares, é marcador específico para a diferenciação muscular.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:150




Actina muscular


Clone: HHF35, Dako

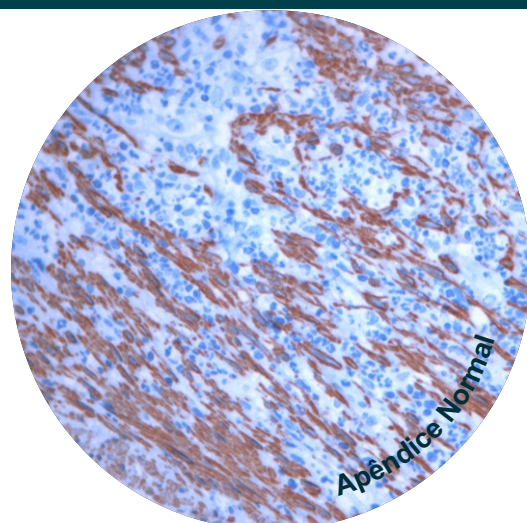
Localização: Citoplasma

Descrição: reconhece os isotipos alfa e gama das actinas musculares, marcando células musculares lisas, esqueléticas e cardíacas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60min CC1
Incubação anticorpo: 32min

Diluição
 1: 300



*CC1: Cell conditioning 1


Miogenina

Clone: F5D1, Dako

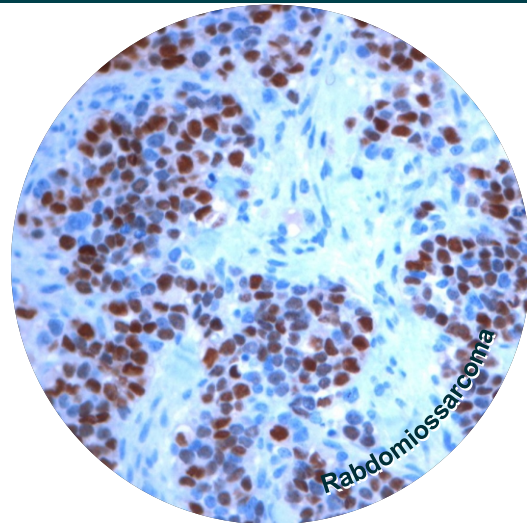
Localização: Núcleo

Descrição: proteína miogênica nuclear, fortemente expressa em Rbdomiossarcomas.

Rosai J, Ackerman's Surgical Pathology LV. 9th ed. Mosby: Edinburgh, 2004.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 100




Mioglobina

Clone: MYO18, Novocastra

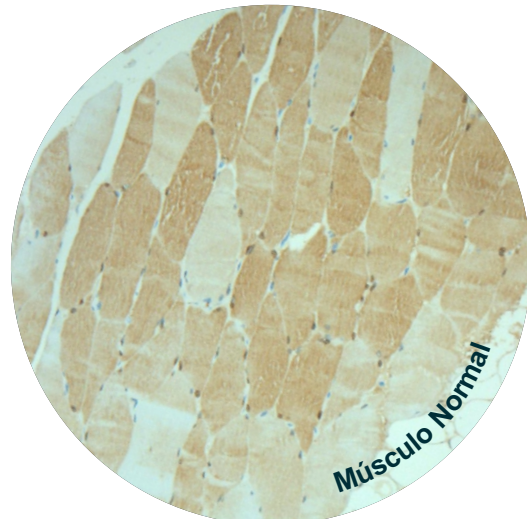
Localização: Citoplasma

Descrição: marcador de diferenciação muscular estriada.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

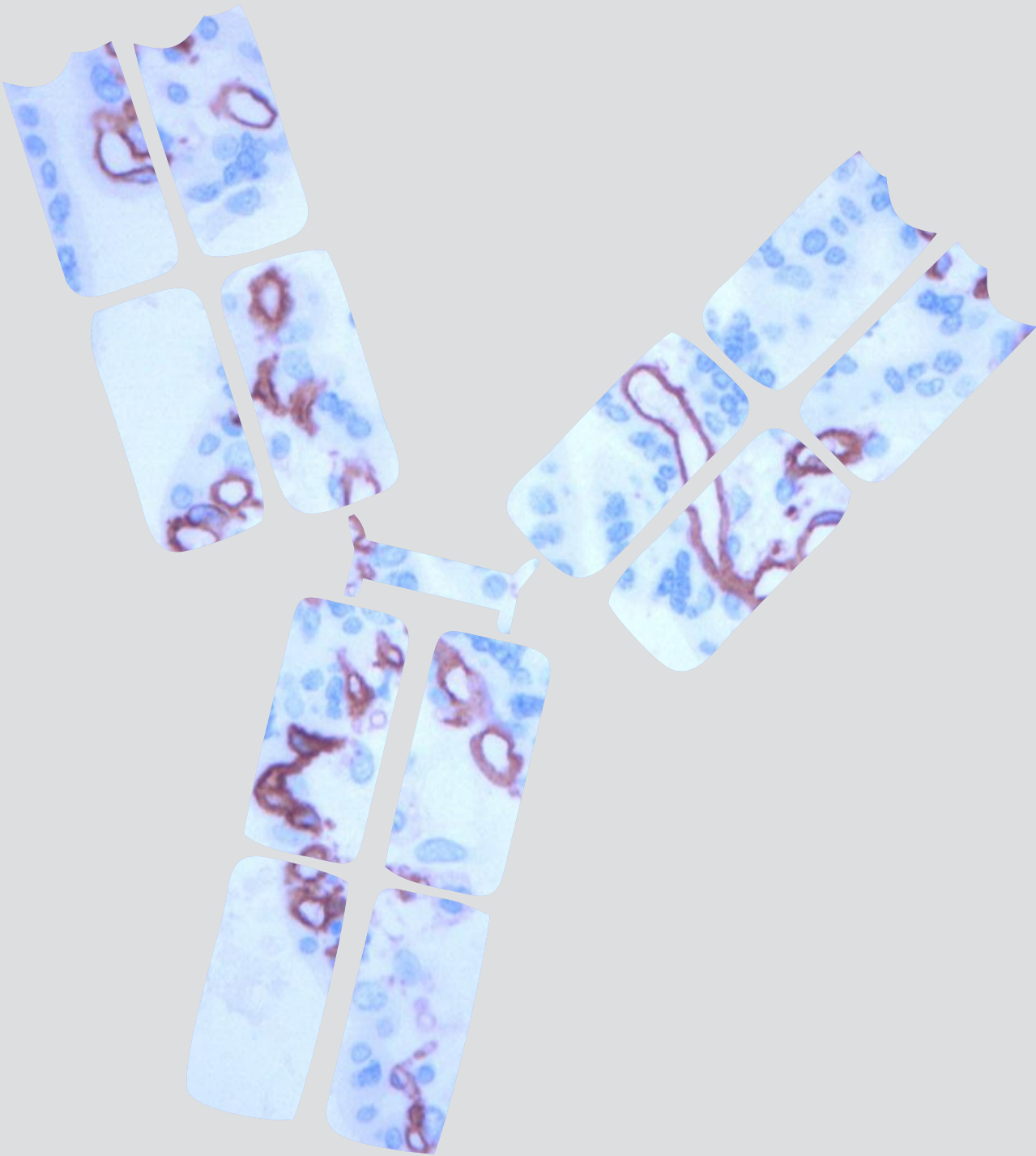
Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 60 min

Diluição
 1:400



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores Endoteliais



CD 31

Clone: JC70A, Dako

Localização: Citoplasma e Membrana

Descrição: expresso em células endoteliais, é um marcador específico e sensível para tumores vasculares.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

**Protocolo
Recuperação**

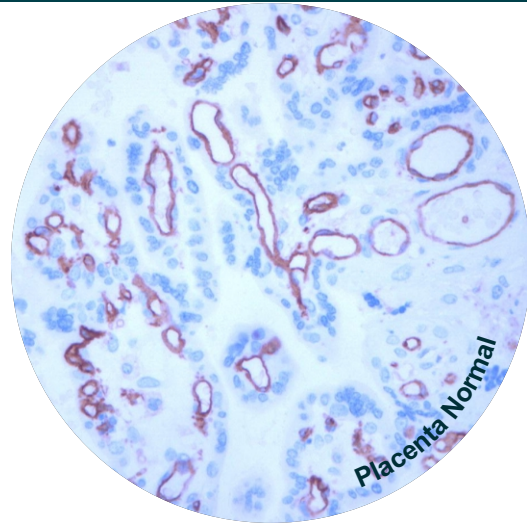


Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 100



CD 34

Clone: QBEnd-10, Dako

Localização: Membrana

Descrição: marcador de células hematopoiéticas primitivas e de células endoteliais.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

**Protocolo
Recuperação**

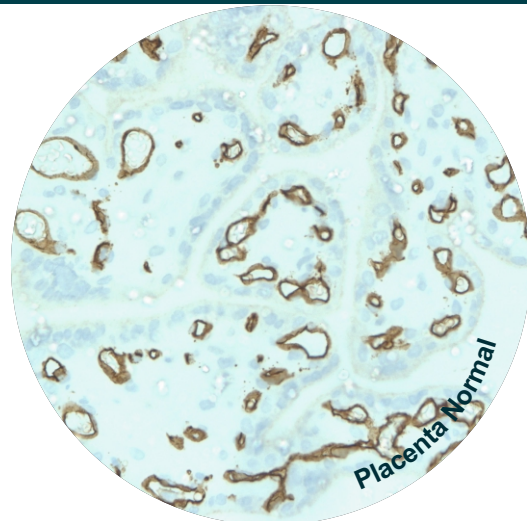


Antigênica: 90 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:100



Fator 8

Clone: F8-86, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: utilizado para demonstrar diferenciação vascular.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

**Protocolo
Recuperação**

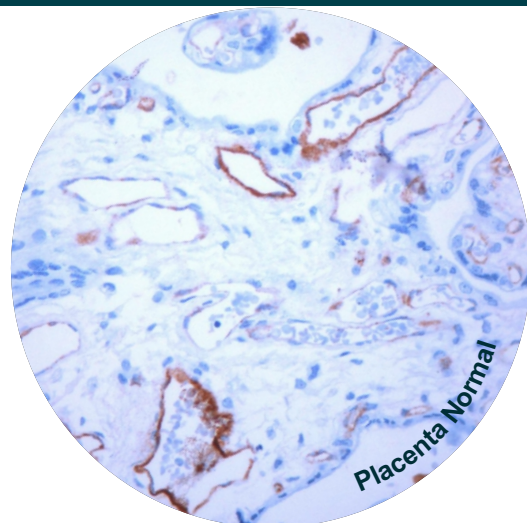


Antigênica: 4 min Protease I
Incubação anticorpo: 32 min



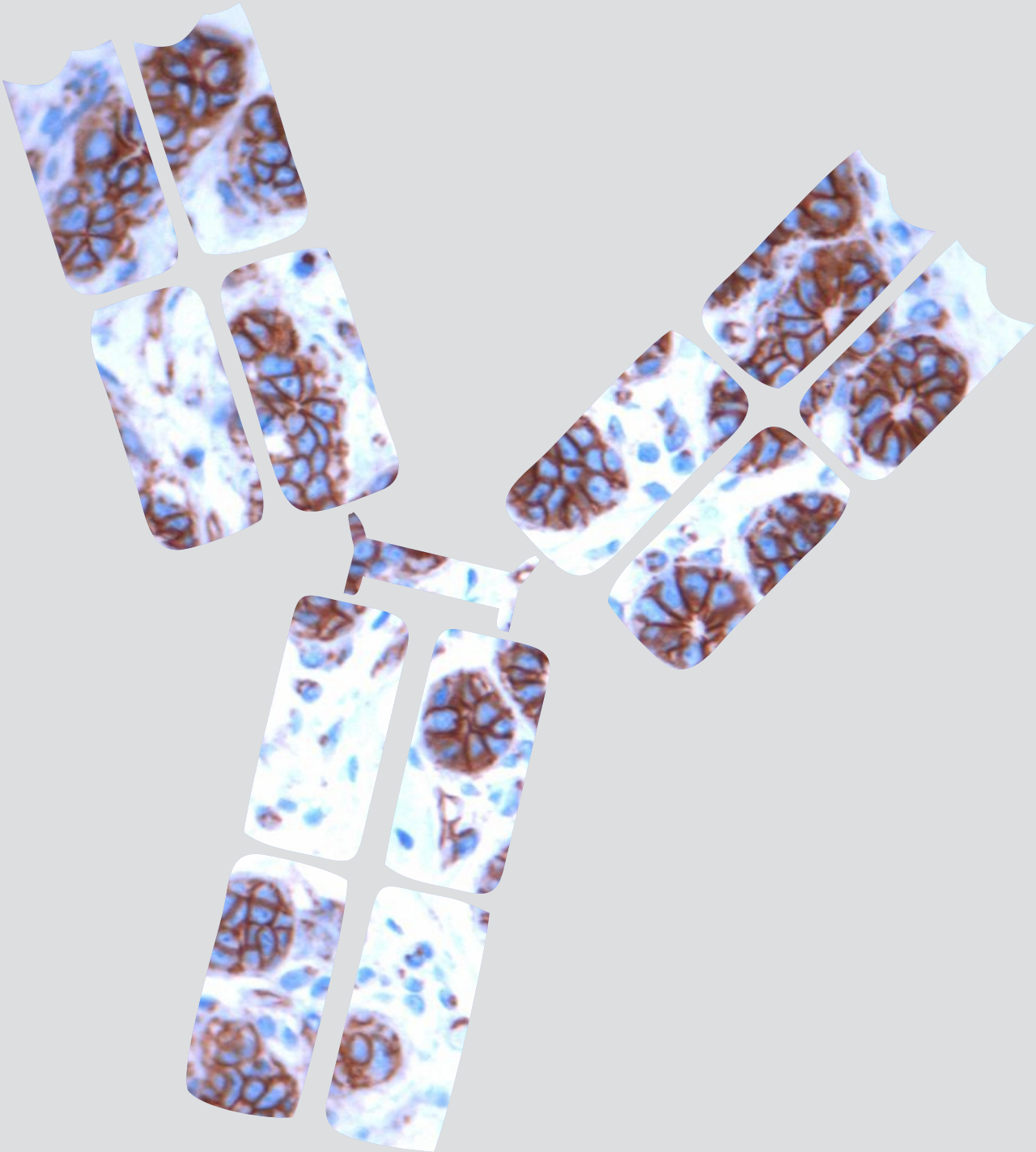
Diluição

1:50



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores Epiteliais



β - Catenina

Clone: β-Catenin-1, Dako

Localização: Membrana

Descrição: A catenina forma a um complexo com a E-caderina em sua porção intracelular. Como participantes da adesão celular o desequilíbrio destas moléculas favorece os processos de invasão e metástase tumoral.

Melo AUC, Da Rosa MRD, Xavier FCA, Ribeiro CF, Ramalho LMP, Santos TS. Revisão Atual da Expressão da Beta-Catenina e suas Implicações no Estudo da Displasia Epitelial Bucal. Rev Bras Cancerol. 2010; 56(3): 381-390.

Protocolo

Recuperação

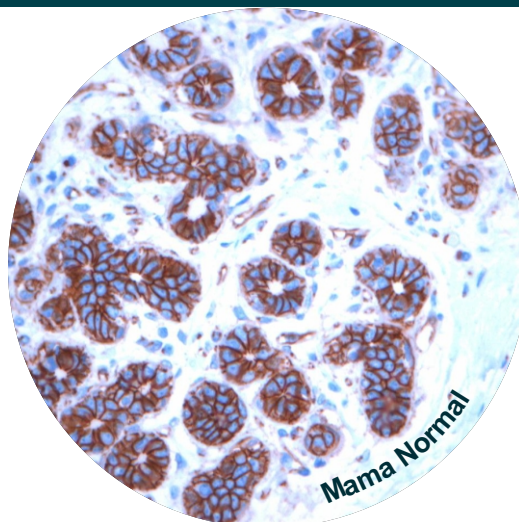
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 100



Citoqueratina 5/6

Clone: D5/16B4, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: expresso pelas células basais da epiderme. Útil no diagnóstico de mesotelioma pleural epitelial, não reage com adenocarcinoma de pulmão.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Ordóñez, NG. Value of Cytokeratin 5/6 Immunostaining in Distinguishing Epithelial Mesothelioma of the Pleura From Lung Adenocarcinoma. American Journal of Surgical Pathology, 1998 Oct; 22(10): 1215-1221.

Protocolo

Recuperação

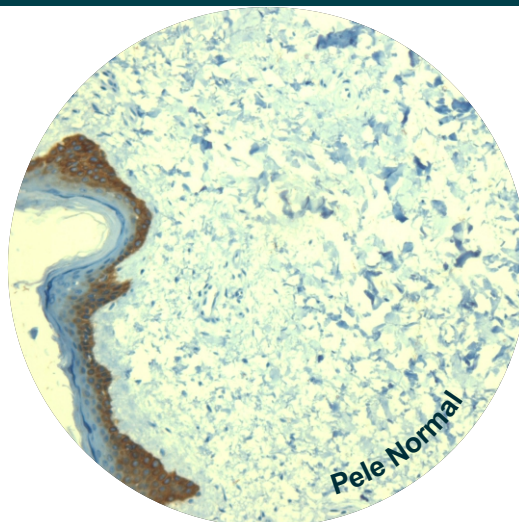
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:200



Citoqueratina 7

Clone: OV-TL12/30, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: útil na caracterização de adenocarcinomas de ovário, pulmão, mama e células do epitélio transicional do trato urinário.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo

Recuperação

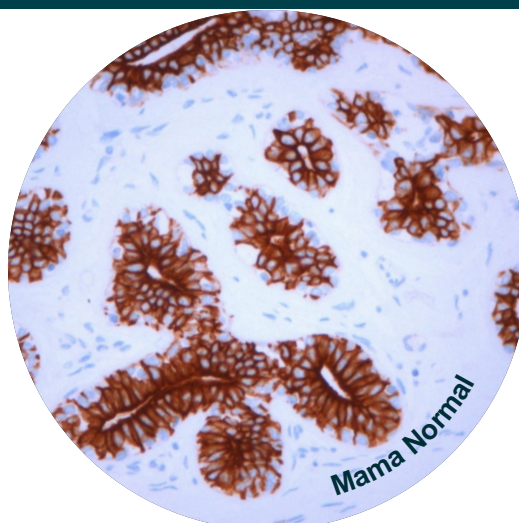
Antigênica: 60min CC1

Incubação anticorpo: 32min



Diluição

1: 400



*CC1: Cell conditioning 1

Citoqueratina 8/18

Clone: 5D3, Novocastra

Localização: Citoplasma

Descrição: citoqueratina de baixo peso molecular, característica de epitélio simples de ácinos e ductos glandulares, porém ausente no epitélio escamoso.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo

Recuperação

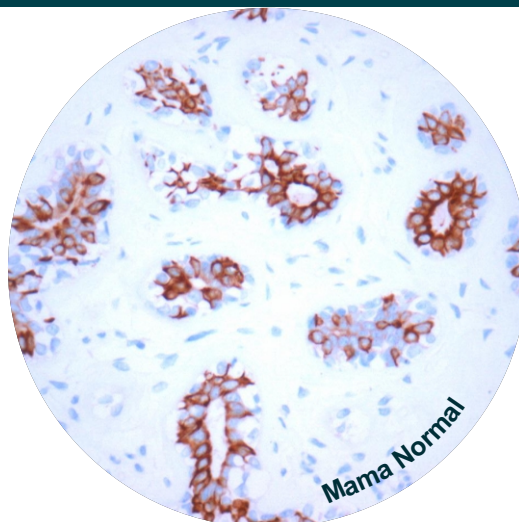
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 350



Citoqueratina 20

Clone: Ks20.8, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: caracteristicamente positiva em carcinomas do tubo digestivo, utilizada em conjunto com CK7 na determinação de sítio primário de carcinoma metastático.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo

Recuperação

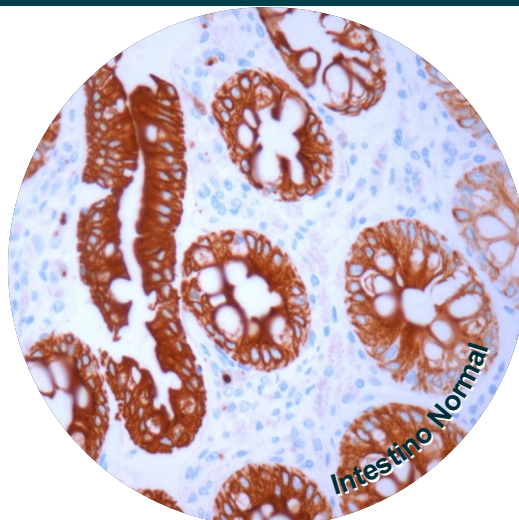
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:350



Citoqueratina AE1/AE3

Clone: AE1/AE3, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: utilizado na demonstração epitelial de tumores morfológicamente indiferenciados.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo

Recuperação

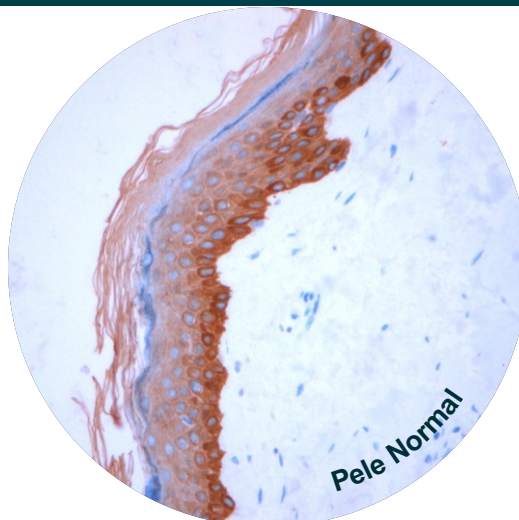
Antigênica: 60min CC1

Incubação anticorpo: 32min



Diluição

1: 1000



*CC1: Cell conditioning 1


Citoqueratina de alto peso molecular (HMW)

Clone: 34 β E12, Dako

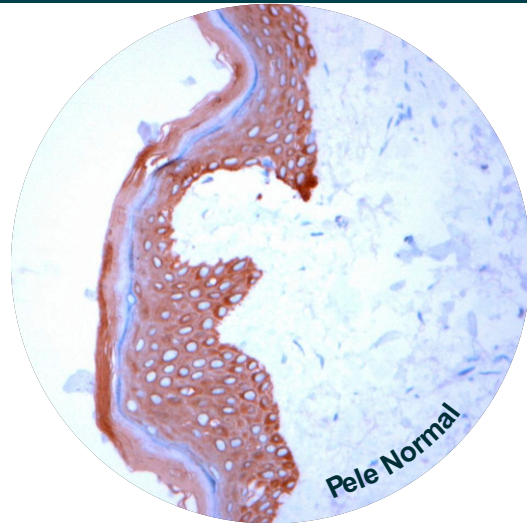
Localização: Citoplasma

Descrição: característica de epitélio escamoso e epitélio ductal, não reage com epitélio simples e seus tumores correspondentes.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 500



Citoqueratina (5,6,8,17 e 19)


Clone: MNF116, Dako


Localização: Citoplasma

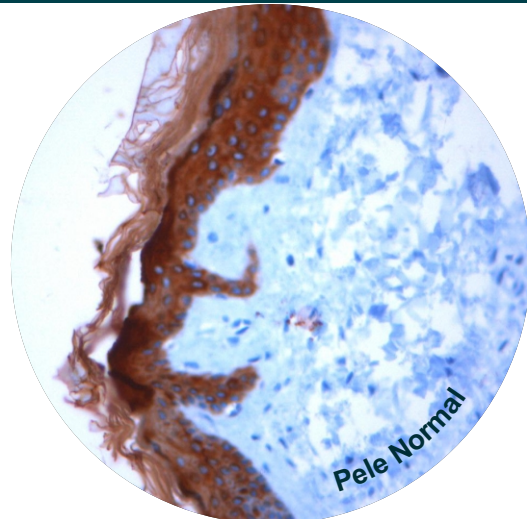
Descrição: Apresenta ampla expressão em epitélio glandular, simples, escamoso estratificado sendo útil na detecção de células epiteliais normais e neoplásicas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Prieto VG, Lugo J, McNutt NS. Intermediate- and low-molecular-weight keratin detection with the monoclonal antibody MNF116. An immunohistochemical study on 232 paraffin-embedded cutaneous lesions. J Cutan Pathol. 1996 Jun; 23(3): 234-41.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:100




Antígeno epitelial de membrana (EMA)


Clone: E29, Dako

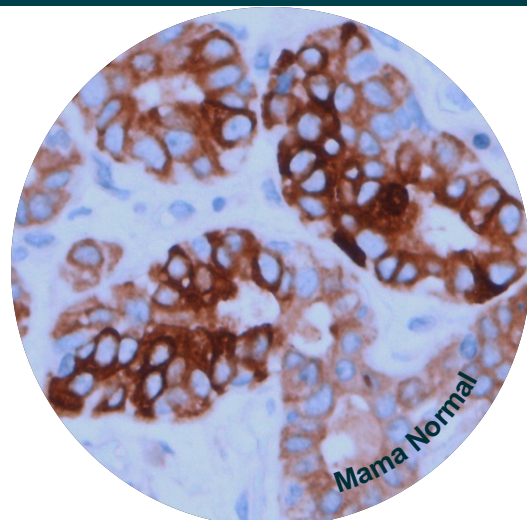
Localização: Membrana e Citoplasma

Descrição: marcador de diferenciação epitelial, presente na maioria dos adenocarcinomas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60min CC1
Incubação anticorpo: 32min

Diluição
 1: 100



*CC1: Cell conditioning 1

Antígeno relacionado ao epitélio

Clone: MOC-31, Dako

Localização: Citoplasma

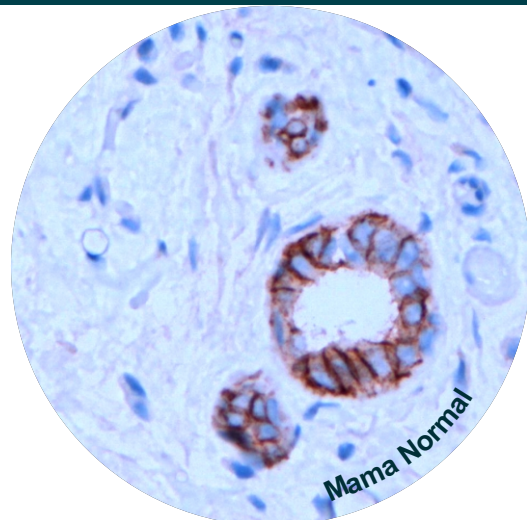
Descrição: reconhece glicoproteínas transmembrana associadas ao epitélio normal e neoplásico.

Rosai J, Ackerman's Surgical Pathology LV. 9th ed. Mosby: Edinburgh, 2004.

Protocolo Recuperação

Antigênica: 90 min CC1
Incubação anticorpo: 90 min
 * uso de amplificador

Diluição
 1: 50*



E-caderina

Clone: NCH-38, Dako

Localização: Membrana

Descrição: molécula de adesão encontrada no epitélio. A perda da expressão da E-caderina tem papel importante na disseminação tumoral podendo indicar um pior prognóstico em neoplasias mamárias.

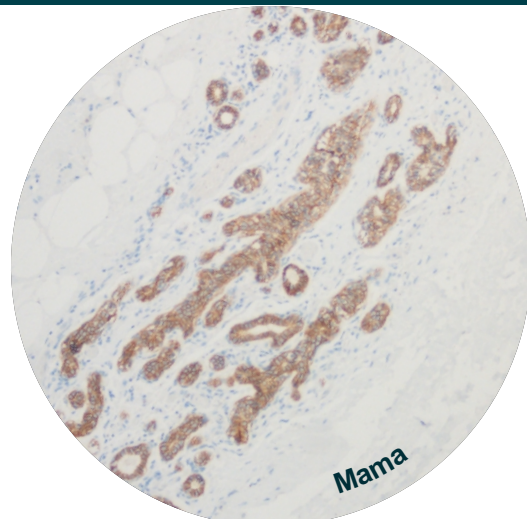
Zuccari DAPC, Pavam MV, Terzian CB, Pereira RS, Ruiz CM, Joanna Coelho Andrade JC. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factors and clinical outcome. Pesq Vet Bras. 2008 Apr; 28(4): 207-215.

Paredes JCAF, Milanezi MG, Reis-Filho JS, Leitão DRA, Athanzio DA, Schmitt FCL. Correlação entre as expressões de E-caderina e de receptores de estrógeno no câncer da mama. J Bras Patol Med Lab. 2002; 38(4): 307-313.

Protocolo Recuperação

Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:150



MUC 1

Clone: VU-4-H5, Santa cruz

Localização: Citoplasma

Descrição: tipo de mucina transmembrana de expressão aumentada em câncer de cólon. Tem sua presença relacionada a um pior prognóstico.

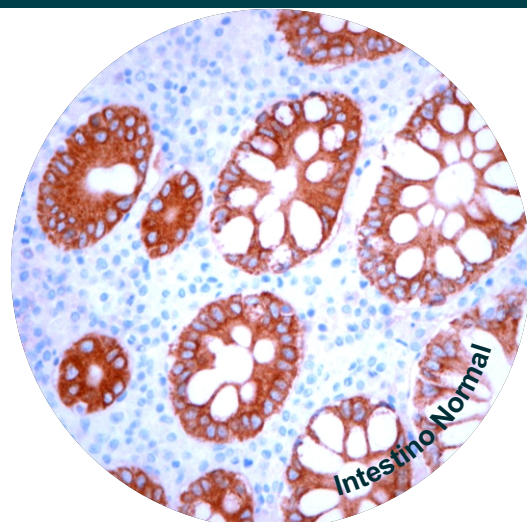
Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev. 2004 Jan-Jun; 23(1-2):77-99.

Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential Expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in Carcinomas of Various Sites. An Immunohistochemical Study. Am J Clin Pathol 2004;122:61-69.

Protocolo Recuperação

Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:50



*CC1: Cell conditioning 1

MUC 2

Clone: CCP58, Zymed

Localização: Membrana/Citoplasma

Descrição: mucina secretora, expressa frequentemente em tumores de origem gastrointestinal. Geralmente preservada em adenocarcinomas mucinosos.

Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential Expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in Carcinomas of Various Sites. An Immunohistochemical Study. Am J Clin Pathol 2004;122:61-69.

Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev. 2004 Jan-Jun; 23(1-2): 77-99.



**Protocolo
Recuperação**

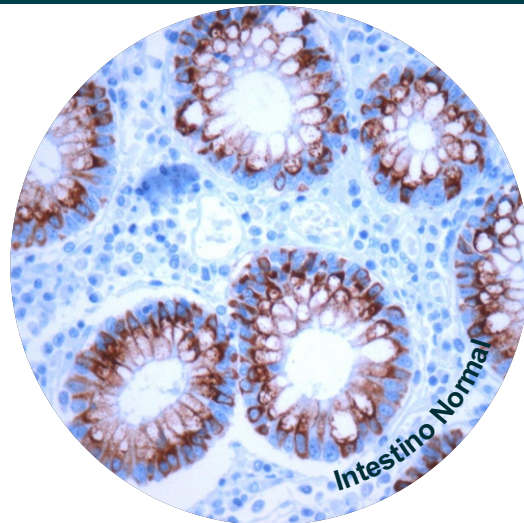
Antigênica: 60min CC1

Incubação anticorpo: 32min



Diluição

1: 200



MUC 4

Clone: 1G8, Zymed

Localização: Citoplasma

Descrição: mucina transmembrana, marcador diagnóstico e preditivo em adenocarcinomas pancreáticos, sua presença indica um pior prognóstico.

Shibahara H, Tamada S, Higashi M, Goto M, Batra S, Hollingsworth MA, et al. MUC4 Is a Novel Prognostic Factor of Intrahepatic Cholangiocarcinoma-Mass Forming Type. Hepatology. 2004; 39(1):220-229.

Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev. 2004 Jan-Jun; 23(1-2): 77-99.



**Protocolo
Recuperação**

Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 50



MUC 5

Clone: 45M1, Zymed

Localização: Citoplasma

Descrição: mucina secretora produto da mucosa gástrica normal. Ausente no cólon pode ser expressa em carcinoma ductal pancreático, adenocarcinomas endocervicais e tumores do trato gastrointestinal.

Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev. 2004 Jan-Jun; 23(1-2): 77-99.



**Protocolo
Recuperação**

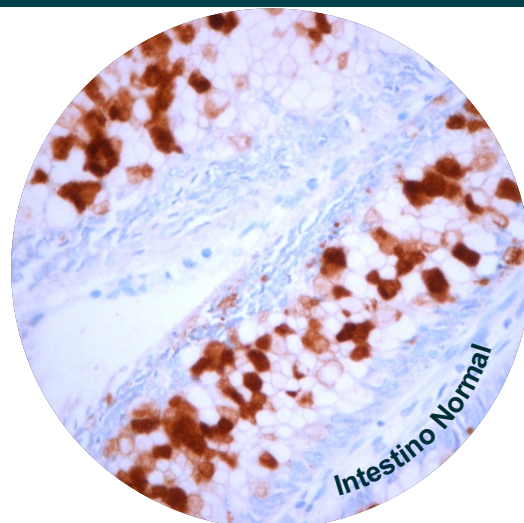
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



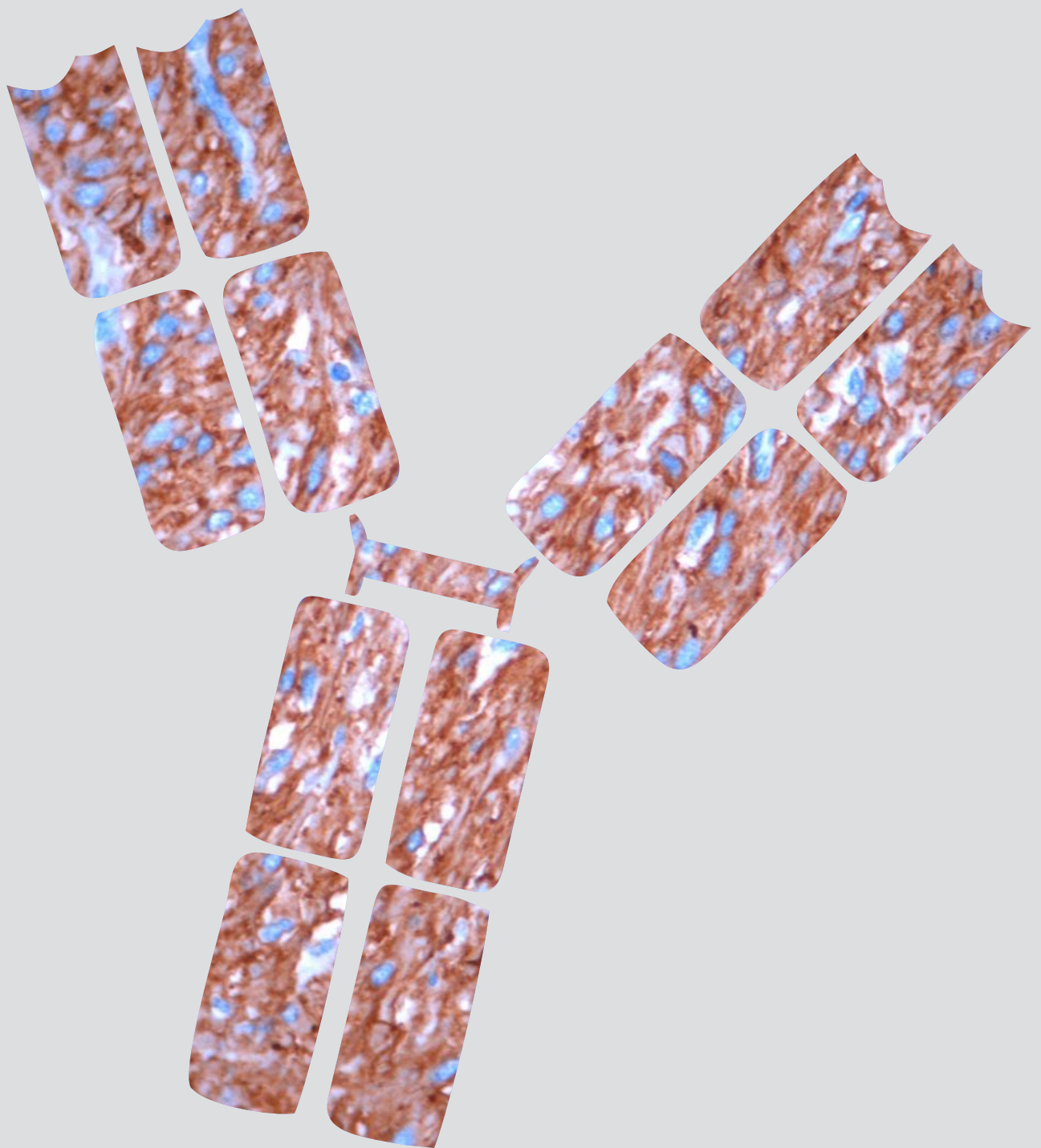
Diluição

1:50



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores Gastrointestinais




CA19-9

Clone: 1116-NS-19-9, Dako

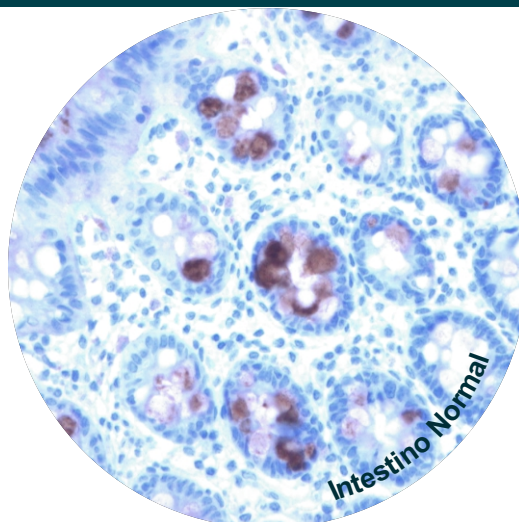
Localização: Citoplasma

Descrição: é uma glicoproteína que contém o antígeno sialyl lewis, usualmente positiva em carcinoma de pâncreas vias biliares e colorretais.

Hadaad LBP. Expressão de marcadores imuno-histoquímicos de origem tecidual e de carcinogênese nos adenocarcinomas tipo intestinal e pancreatobiliar da ampola de Vater. [Tese]Faculdade de medicina da universidade de São Paulo. São Paulo 2009

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 90 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 50




CD 117


Clone: Policlonal, Dako

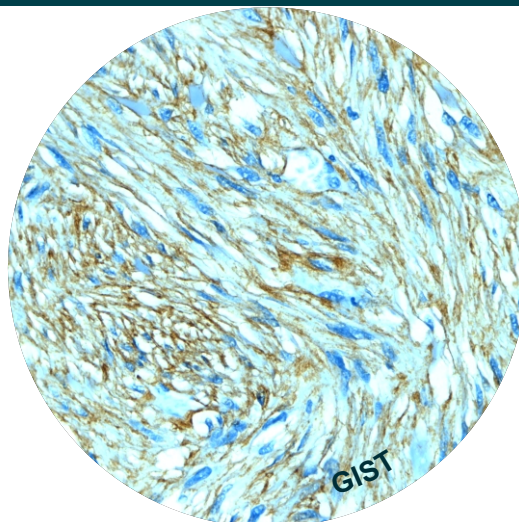
Localização: Citoplasma e Membrana

Descrição: glicoproteína transmembrana produto do gene kit, membro da família de receptores de tirosina-quinases. A detecção de expressão é importante no diagnóstico dos tumores estromais gastrointestinais (GIST).

Dirnhofer S, Zimpfer A, Went P. The diagnostic and predictive role of kit (CD117). Ther Umsch. 2006 Apr;63(4):273-8.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** Não necessário
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:100




CD X2

Clone: AMT 28, Novocastra

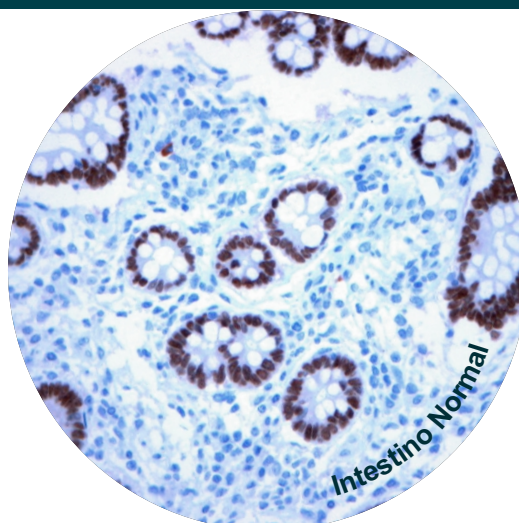
Localização: Núcleo

Descrição: é o marcador com maior sensibilidade e especificidade para tumores de origem intestinal.

Hadaad LBP. Expressão de marcadores imuno-histoquímicos de origem tecidual e de carcinogênese nos adenocarcinomas tipo intestinal e pancreatobiliar da ampola de Vater. [Tese]Faculdade de medicina da universidade de São Paulo. São Paulo 2009

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 90min CC1
Incubação anticorpo: 90min
 * uso de amplificador

Diluição
 1: 25*





*CC1: Cell conditioning 1

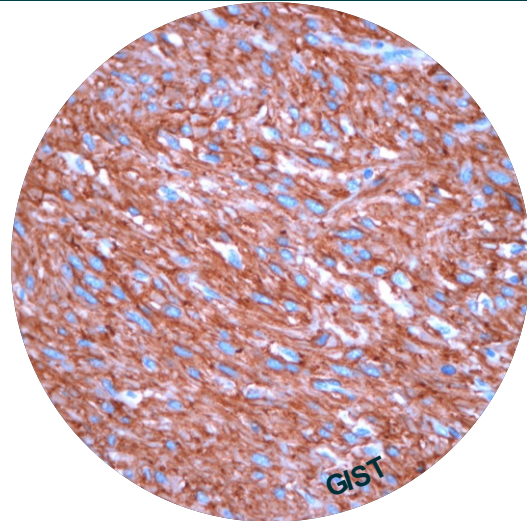
DOG-1

Clone: K9, Novocastra
Localização: Citoplasma

Descrição: (discovered on GIST-1), proteína produto de um gene específico descoberto em tumores gastrointestinais (GISTs), está especificamente expressa nessa doença e também expressa na ausência da mutação do gene Kit.

West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, et al. The Novel Marker, DOG1, Is Expressed Ubiquitously in Gastrointestinal Stromal Tumors Irrespective of KIT or PDGFRA Mutation Status. *Am J Pathol.* 2004 Jul; 165(1): 107–113.

<p>Protocolo Recuperação  Antigênica: 90 min CC1 Incubação anticorpo: 32 min</p>	 Diluição 1:100
--	---





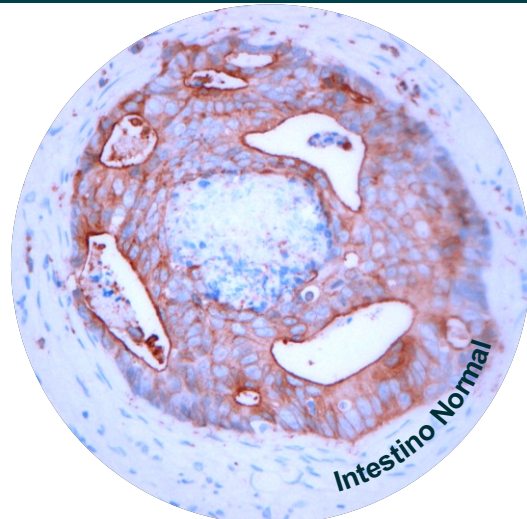
Vilina

Clone: CWB1, Novocastra
Localização: Citoplasma/Membrana

Descrição: proteína expressa nas microvilosidades, com alta taxa de expressão em carcinoma colorretal, gástrico e pancreático.

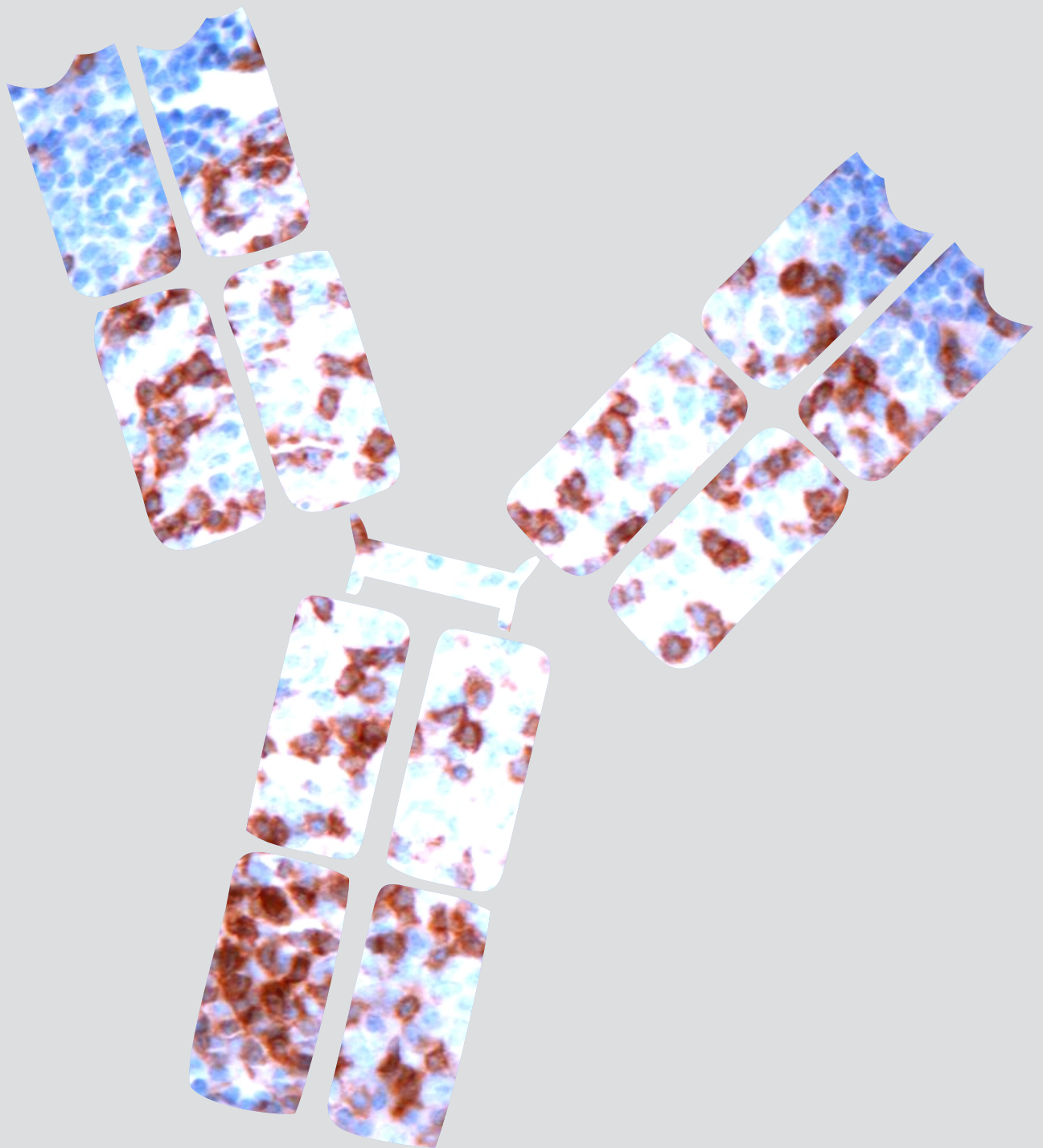
Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da Amrigs.* Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

<p>Protocolo Recuperação  Antigênica: 60 min CC1 Incubação anticorpo: 32 min</p>	 Diluição 1:300
--	---



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores Histiocitários



Anexina 1

Clone: Policlonal, Spring bioscience

Localização: Citoplasma e Membrana

Descrição: O anticorpo dirigido contra a proteína anexina A1, produto do gene relacionado a fagocitose, pode ser útil no diagnóstico de Leucemia de células pilosas.

Miller RT. Annexin A1: A New Marker for Hairy Cell Leukemia. The focus. Immunohistochemistry. 2005 Nov [Acesso em 25 fev 2015]. Disponível em: http://www.ihcworld.com/_newsletter/2005/2005-11_Annexin_A1_v1.pdf



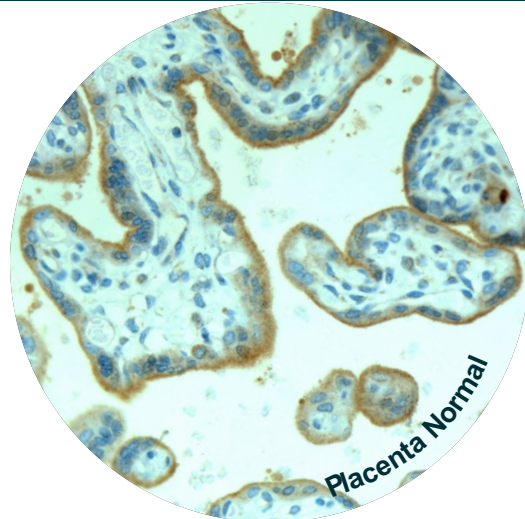
**Protocolo
Recuperação**

Antigênica: 90 min CC1
Incubação anticorpo: 90 min



Diluição

1: 50



CD 68

Clone: PGM1, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: é encontrado no citoplasma de histiócitos, células mielóides e macrófagos, sendo útil na classificação de neoplasias histiocíticas e mielóides.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.



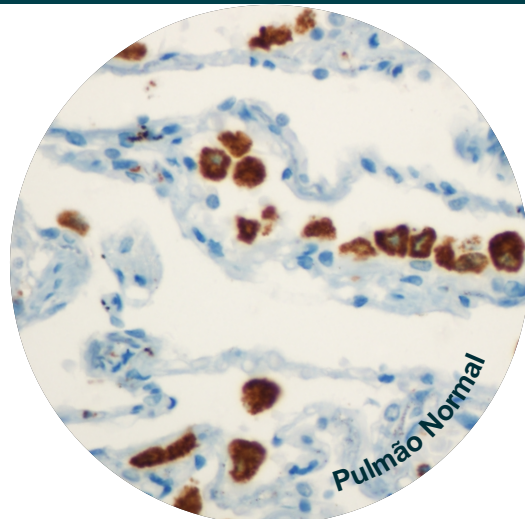
**Protocolo
Recuperação**

Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:300



Lisozima

Clone: Policlonal, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: É uma enzima capaz de digerir a parede de algumas bactérias, está contida em grânulos específicos dos neutrófilos. Corando células mielóides, histiócitos, macrófagos e monócitos. É útil na classificação de neoplasias histiocíticas.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.



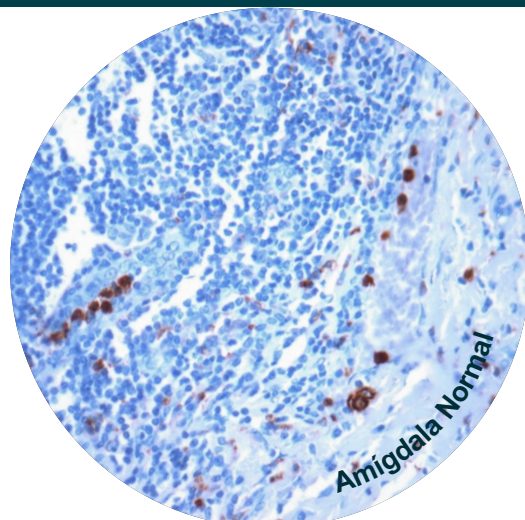
**Protocolo
Recuperação**

Antigênica: Não necessário
Incubação anticorpo: 60 min



Diluição

1: 500



*CC1: Cell conditioning 1

Mieloperoxidase

Clone: 59A5, Novocastra

Localização: Citoplasma

Descrição: enzima pró-inflamatória expressa por neutrófilos e monócitos circulantes, a sua ação resulta em dano oxidativo contribuindo para lesões nos tecidos.

E. Brown KE, Brunt EM, Heinecke JW. Immunohistochemical Detection of Myeloperoxidase and Its Oxidation Products in Kupffer Cells of Human Liver. Am J Pathol. 2001 Dec; 159(6):2081–2088.

Protocolo
Recuperação



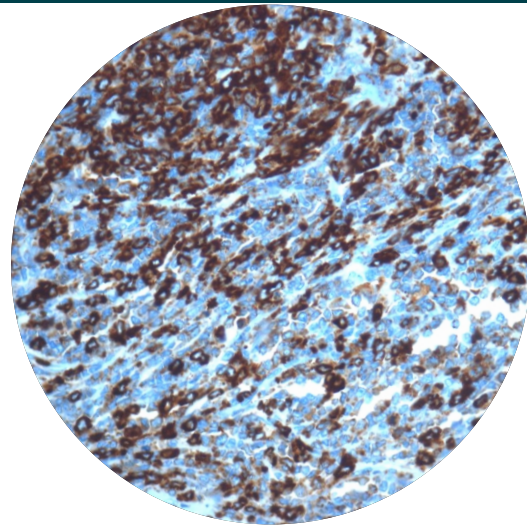
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



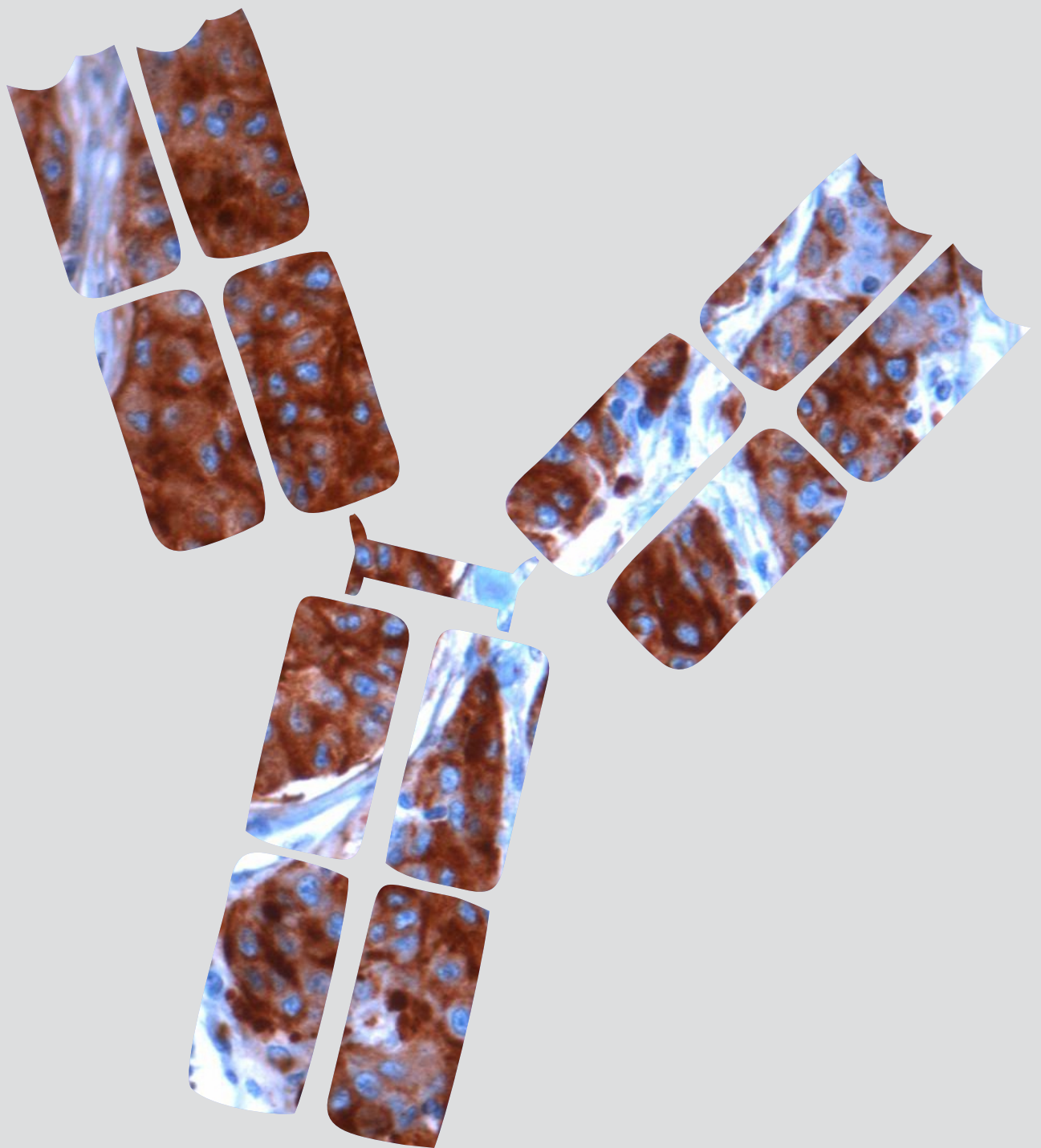
Diluição

1: 300



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores de Melanoma




Melanosome

Clone: HMB45, Dako

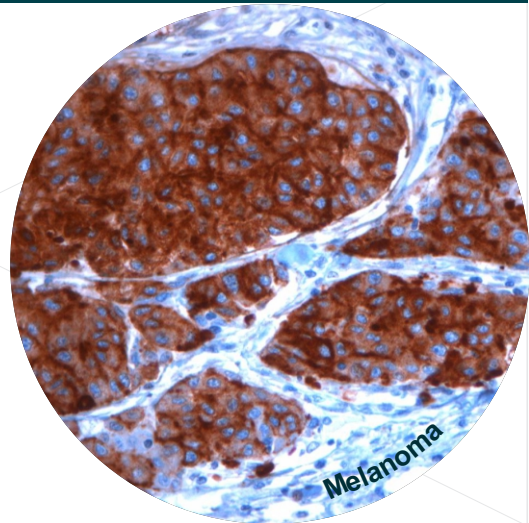
Localização: Citoplasma

Descrição: (Human Melanoma Black) reage com um oligossacarídeo presente em pré-melanossomas, específico para diferenciação melanocítica em tumores malignos.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 300



Melan-A


Clone: A103, Dako


Localização: Citoplasma

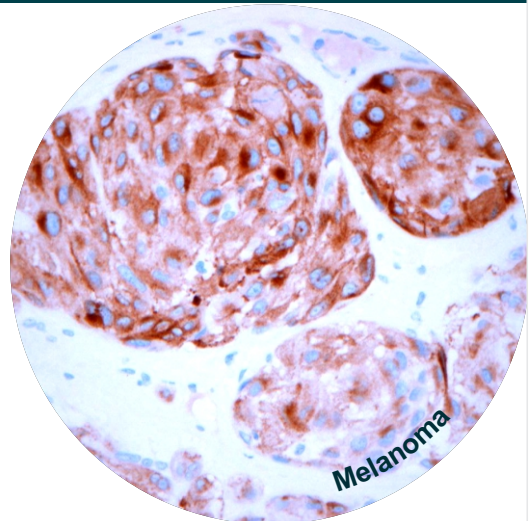
Descrição: marcador associado aos melanócitos. É amplamente utilizado no diagnóstico de melanoma humano.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Sztramska A, Dymerska D, Chwirot BW. Skin layer-specific Melan-A expression during progression of human cutaneous melanoma: implications for diagnostic applications of the marker. Melanoma Res. 2008 Aug;18(4):259-67.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:100




Proteína S100

Clone: Policlonal, Dako

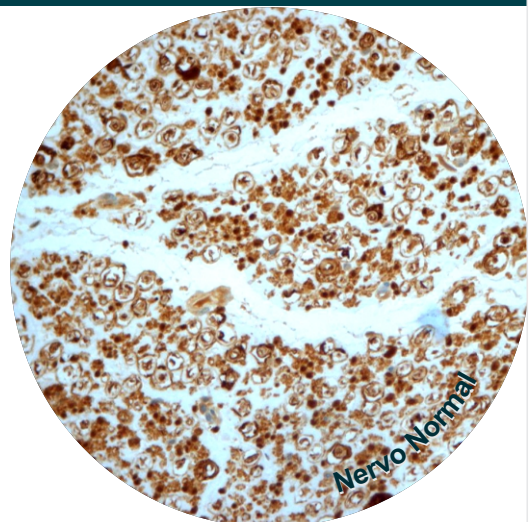
Localização: Citoplasma/Núcleo

Descrição: encontrada em astrócitos, oligodendrócitos, células ependimárias, neurônios, células de Schwann. Considerada marcador de células neurais e derivadas da crista neural.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 2000



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores de Linfoma



BCL2 Oncoproteína

Clone: 124, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: o produto do gene bcl2 é uma proteína de membrana mitocondrial com papel na prevenção da apoptose, a expressão desta proteína pode ser encontrada em diversas neoplasias linfóides.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo Recuperação

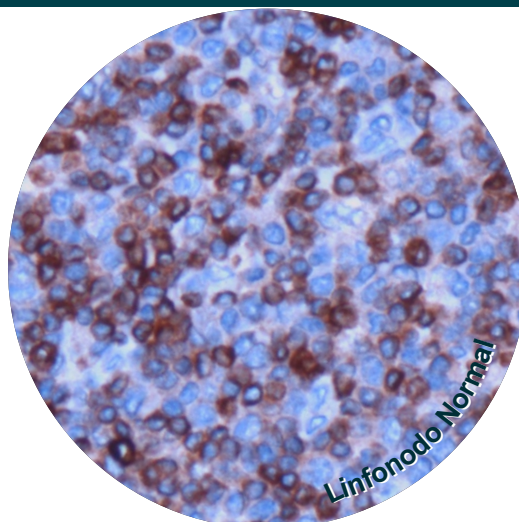
Antigênica: 90 min CC1

Incubação anticorpo: 90 min

*Uso de amplificador

Diluição

1: 25*



BCL6

Clone: PG-B6p, Dako

Localização: Núcleo

Descrição: expresso principalmente em centros germinativos normais.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrigs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Protocolo Recuperação

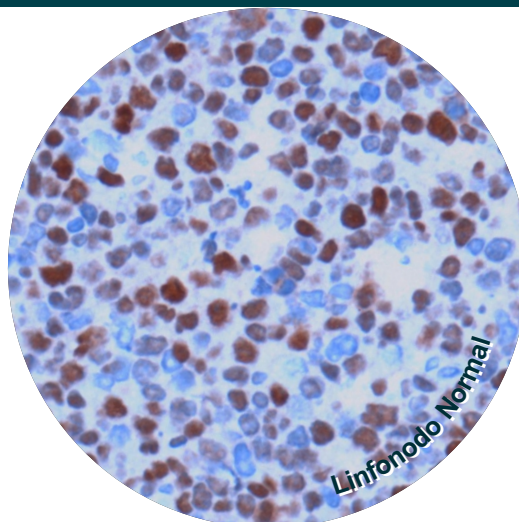
Antigênica: 90 min CC1

Incubação anticorpo: 90 min

*Uso de amplificador

Diluição

1:50*



BOB1

Clone: TG14, Novocastra

Localização: Citoplasma/Núcleo

Descrição: (Bcell Oct-binding protein 1). Proteína 1 de ligação a octâmero específico de célula B, é um fator de transcrição de células B do centro germinativo.

Browne P, Petrosyan K, Hernandez A, Chan JA. The B-cell transcription factors BSAP, Oct-2, and BOB.1 and the pan-B-cell markers CD20, CD22, and CD79a are useful in the differential diagnosis of classic Hodgkin lymphoma. Am J Clin Pathol. 2003 Nov; 120(5):767-77.

Protocolo Recuperação

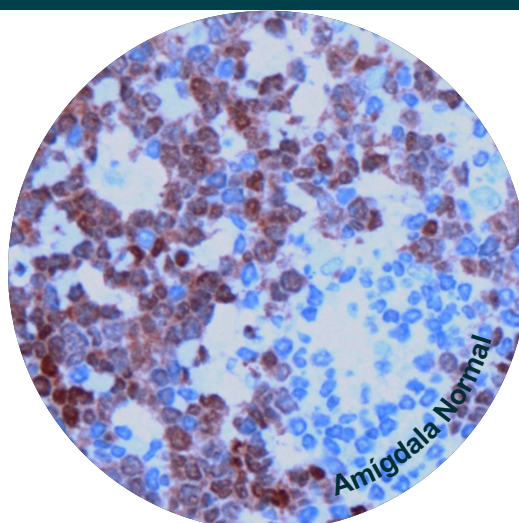
Antigênica: 90 min CC1

Incubação anticorpo: 90 min

*Uso de amplificador

Diluição

1: 25*



*CC1: Cell conditioning 1

CD10

Clone: 56C6, Novocastra

Localização: Membrana

Descrição: também conhecido como antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda (CALLA) foi identificado na superfície das células B imaturas na medula óssea e células B dos centros germinativos de linfonodos.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrigs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

**Protocolo
Recuperação**

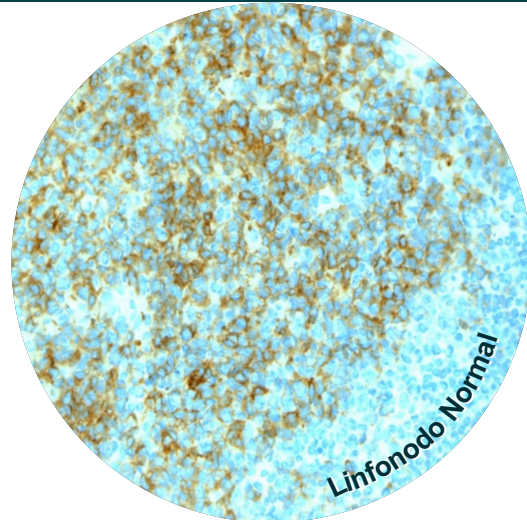


Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição



1: 20



CD19

Clone: LE-CD19, Dako

Localização: Membrana

Descrição: Em células normais, a proteína é expressa na linhagem de linfócitos B. Expressão de CD19 é induzida no ponto de comprometimento com a linhagem B durante a diferenciação das células-tronco hematopoéticas, a sua expressão continua nas células pré-B e diferenciação de células B maduras, até que, perdida durante a diferenciação terminal em células plasmáticas.

Scheuermann RH, Racila E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. Leuk Lymphoma. 1995 Aug; 18(5-6): 385-97.

**Protocolo
Recuperação**

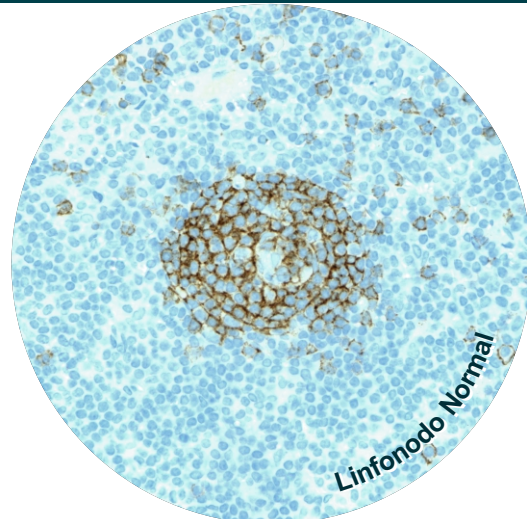


Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição



1:100



CD20

Clone: L26, Dako

Localização: Membrana

Descrição: molécula restrita as células B, maduras e pré maduras. É perdida antes da diferenciação terminal das células B em plasmócitos. Melhor marcador pan-B, bastante sensível e específico, é expresso em cerca de 95% dos Linfomas de células B.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrigs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

**Protocolo
Recuperação**

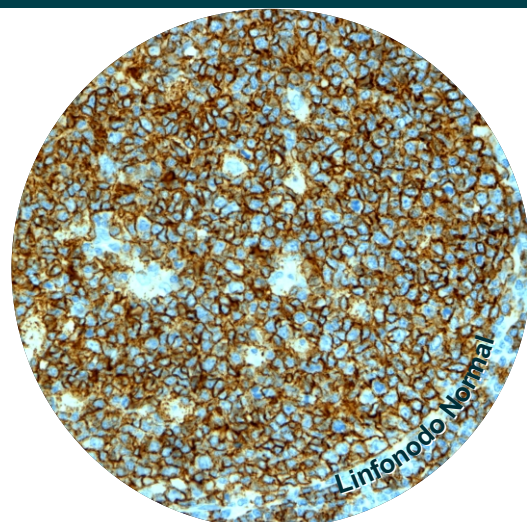


Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição



1: 500



*CC1: Cell conditioning 1

CD21

Clone: 1F8, Dako

Localização: Membrana

Descrição: presente em células reticulares dendríticas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo Recuperação



Antigênica: 4 min Protease I

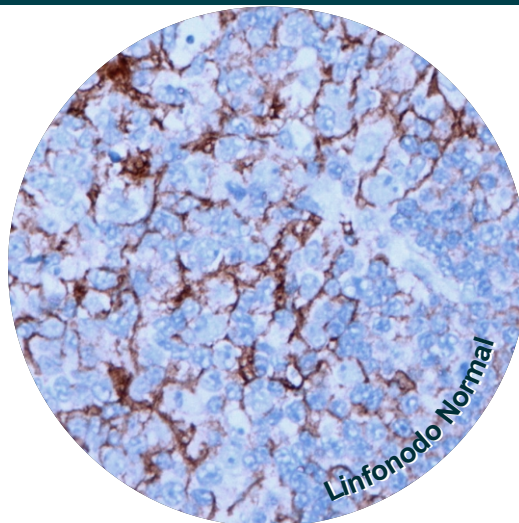
Incubação anticorpo: 60 min

*Uso de amplificador



Diluição

1: 25*



CD23

Clone: MHM6, Dako

Localização: Membrana

Descrição: expresso durante a ativação dos linfócitos B. É um marcador de Leucemia linfocítica crônica de células B/Linfoma linfocítico de pequenas células.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrighs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Protocolo Recuperação



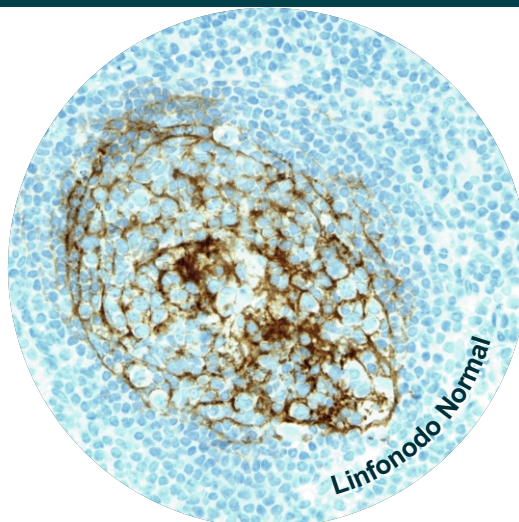
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:150



CD38

Clone: SPC32, Novocastra

Localização: Membrana

Descrição: possui atividade enzimática e também funciona como um receptor, e para aderência e sinalização em leucócitos. CD38 também é marcador de prognóstico em Leucemias e outras doenças.

Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. Leuk Res. 2001 Jan; 25(1):1-12.

Protocolo Recuperação



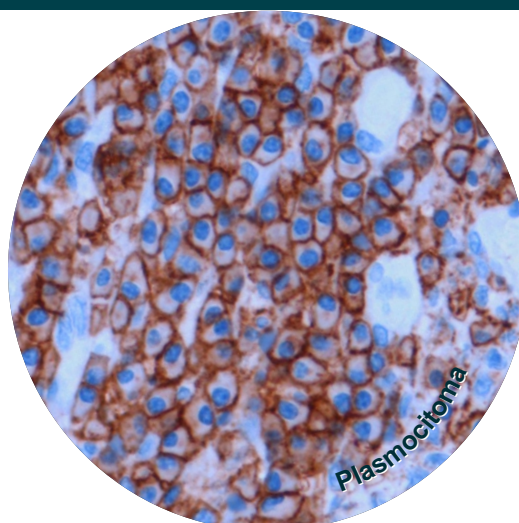
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 400



*CC1: Cell conditioning 1


CD79


Clone: HM57, Dako

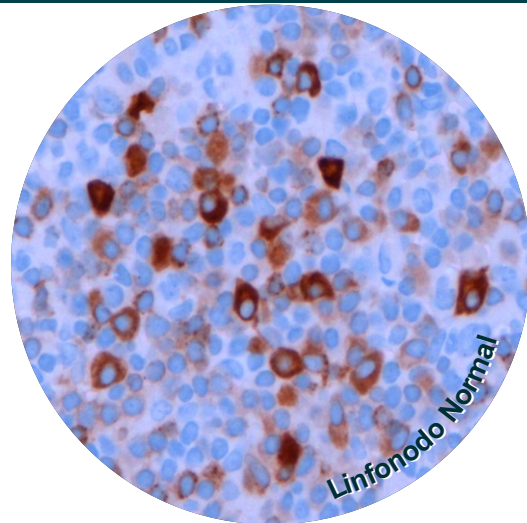
Localização: Membrana

Descrição: parte do complexo receptor de antígeno dos linfócitos B, útil na classificação de linfomas B.

Barra, MB. O uso da imunistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrigs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 **1: 200**




CD138

Clone: MI15, Dako

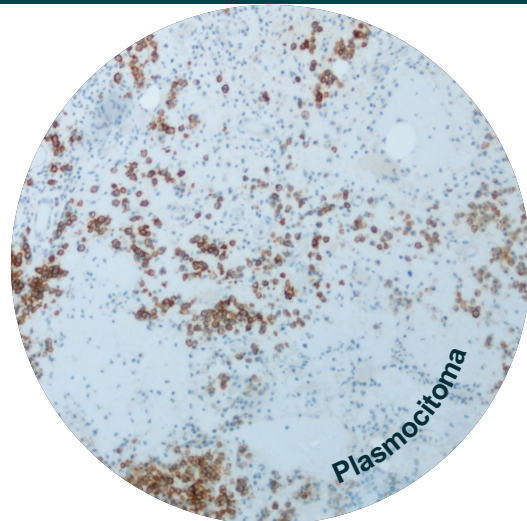
Localização: Membrana

Descrição: permite a quantificação e a avaliação de plasmócitos na medula óssea, apresentando alta sensibilidade e especificidade na detecção do acometimento focal ou doença residual da medula por Mieloma múltiplo.

Andrade VP. Aspectos morfológicos da infiltração da medula óssea por condições exibindo diferenciação plasmocitária e gamopatia monoclonal. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009; Jul/Aug; 31(4): 273-279.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 90 min CC1
Incubação anticorpo: 90 min

Diluição
 **1: 100**




MUM1

Clone: mum1p, Dako

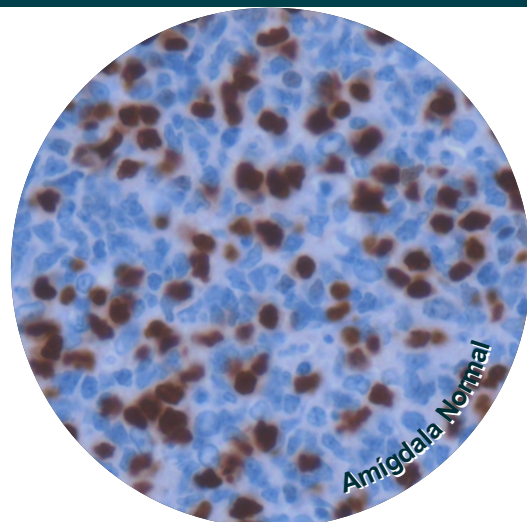
Localização: Núcleo/Citoplasma

Descrição: a proteína é produto do gene homólogo associado ao Mieloma. Foi detectado em células T ativadas normais e neoplásicas, e tem expressão geralmente paralela ao CD30, nas células Reed-Sternberg no Linfoma de Hodgkin. Provavelmente MUM1 está envolvida nas fases tardias da diferenciação de células B e ativação de células T e está desregulada no Linfoma de grandes células B Difuso.

Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. Blood. 2000 Mar; 95(6):2084-92.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 **1:100**



*CC1: Cell conditioning 1


CD1a

Clone: 010, Dako

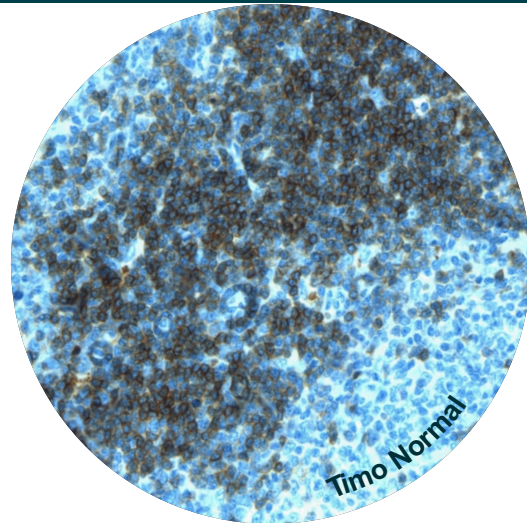
Localização: Membrana

Descrição: glicoproteína relacionada ao MHC classe I. Marcador das células da histiocitose de células de Langerhans.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 100




CD3


Clone: F7.2.38, Dako

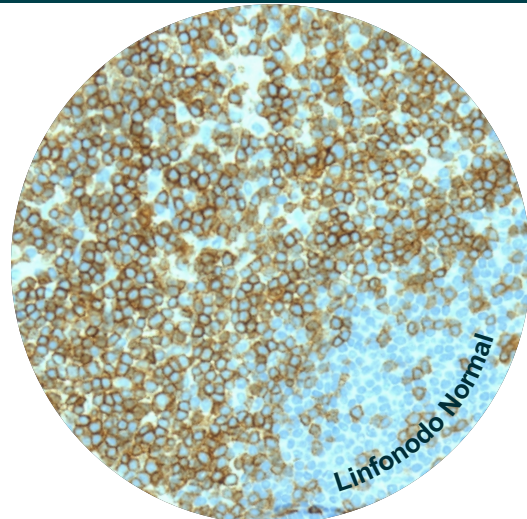
Localização: Membrana

Descrição: marcador muito sensível e específico para demonstração de diferenciação T.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:350




CD5


Clone: CD5/54/F6, Dako

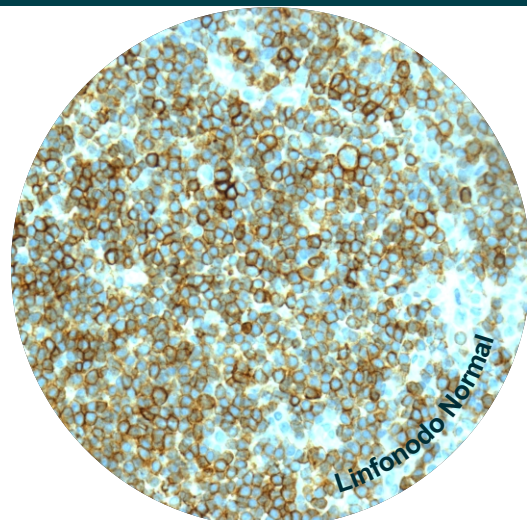
Localização: Membrana

Descrição: presente na superfície das células T, porém está expresso em dois tipos de linfomas de células B, o Linfoma do Manto e linfoma/leucemia linfocítica B.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 250



*CC1: Cell conditioning 1

CD7


Clone: CBC.37, Dako


Localização: Membrana

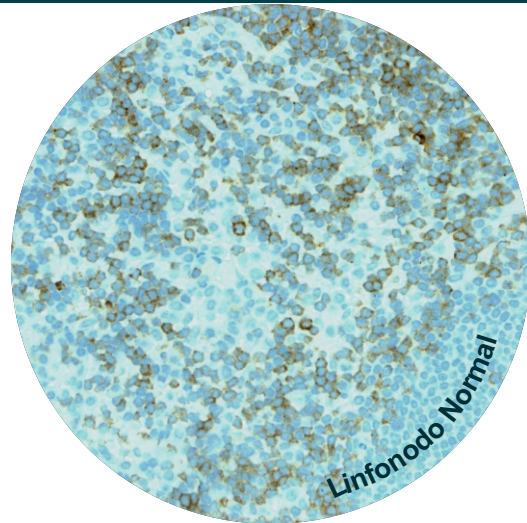
Descrição: presente na maioria das células T, expressa precocemente em linfócitos T imaturos sua expressão é comumente perdida em neoplasias de células T.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrigs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 50




CD8

Clone: C8/144B, Dako

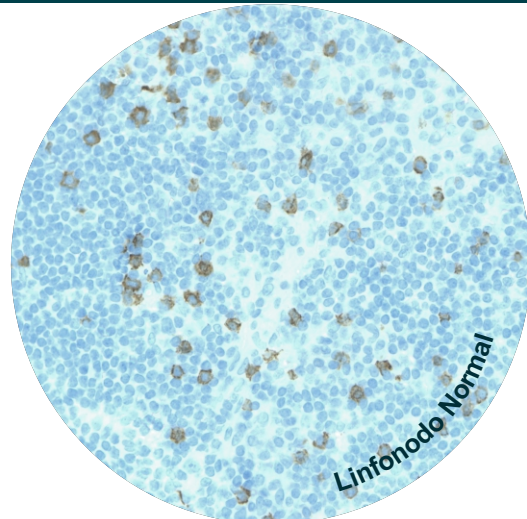
Localização: Membrana

Descrição: caracteriza as células T supressoras/citotóxicas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:1000




Granzime B


Clone: GrB-7, Dako

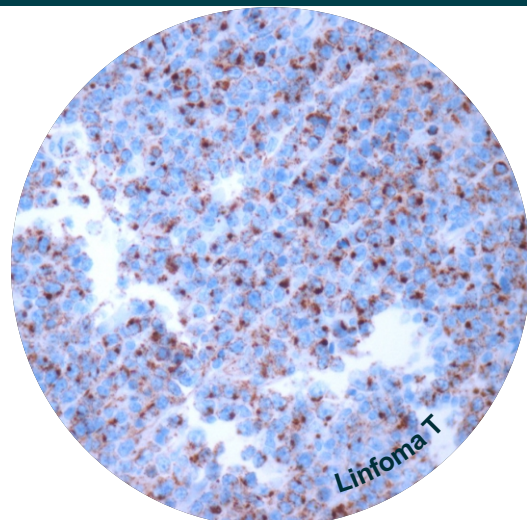
Localização: Citoplasma

Descrição: é característica das células NK.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 90 min CC1
Incubação anticorpo: 90 min

Diluição
 1: 50



*CC1: Cell conditioning 1

PD 1

Clone: NAT, Abcam

Localização: Membrana

Descrição: (Programmed Death-1), proteína da morte celular programada 1, é um marcador de células T bastante sensível para o diagnóstico de linfomas de células-T periféricas.

Shnan CK, Warnke RA, Arber DA, Natkunam Y. PD-1 Expression in T-cell Lymphomas and reactive lymphoid entities: Potential overlap in staining patterns between lymphoma and viral lymphadenitis. Am J Surg Pathol. 2010 Feb; 34(2): 178.

Protocolo
Recuperação



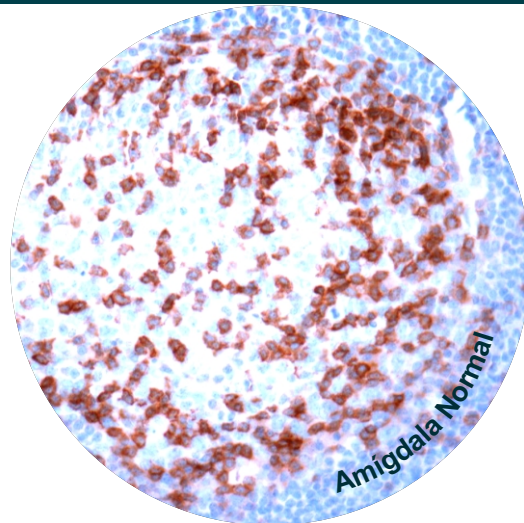
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:50



TIA 1

Clone: TIA-1, Abcam

Localização: Citoplasma

Descrição: (T-cell intracellular antigen-1) proteína associada aos grânulos citotóxicos presentes em linfócitos T citotóxicos e células NK. Grânulos contendo TIA 1 são encontrados no citoplasma das células neoplásicas em Linfomas de células T.

Vanderweyde T, Yu H, Varnum M, Liu-Yesucevitz L, Citro A, Ikezu T, et al. Contrasting Pathology of the Stress Granule Proteins TIA-1 and G3BP in Tauopathies J Neurosci. 2012 13 de junho; 32 (24): 8.270-8.283.

Felgar RE, Macon WR, Kinney MC, Roberts S, Pasha T, Salhany KE. TIA-1 expression in lymphoid neoplasms. Identification of subsets with cytotoxic T lymphocyte or natural killer cell differentiation. Am J Pathol. 1997 Jun; 150(6): 1893-1900.

Protocolo
Recuperação



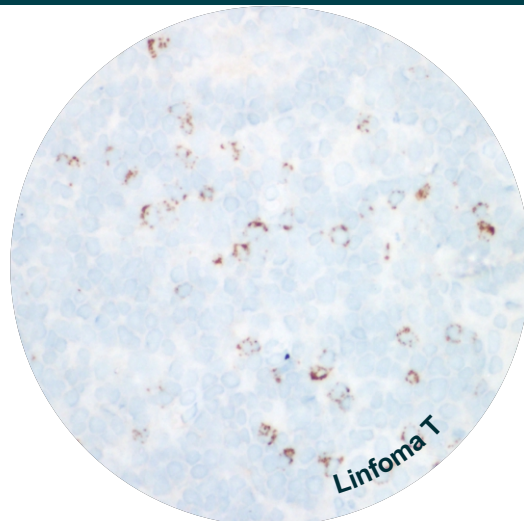
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:100



ALK (CD246)

Clone: ALK1, Dako

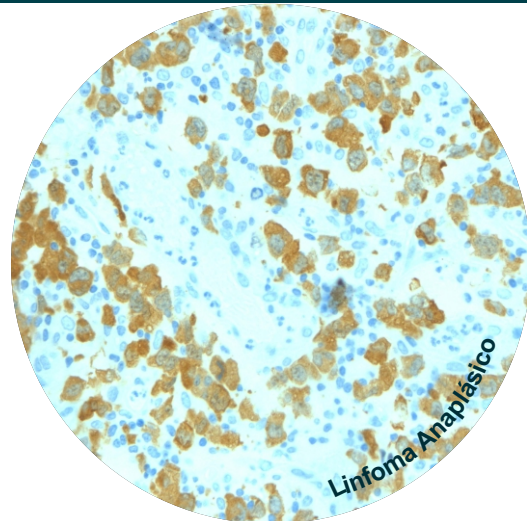
Localização: Citoplasma/Núcleo

Descrição: quinase do linfoma anaplásico, está associada ao linfoma anaplásico de grandes células.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrigs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 250



CD15

Clone: BY87, Novocastra

Localização: Membrana

Descrição: reage com antígeno encontrado em granulócitos maduros. É positivo em até 75% dos Linfomas de Hodgkin.

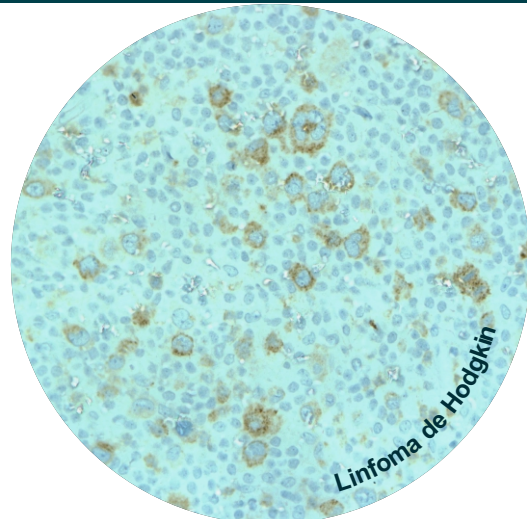
A expressão pode ser de membrana, paranuclear (Golgi) ou ambas.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrigs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 84 min CC2
Incubação anticorpo: 60 min

Diluição
 1:25



CD30

Clone: Ber-H2, Dako

Localização: Membrana

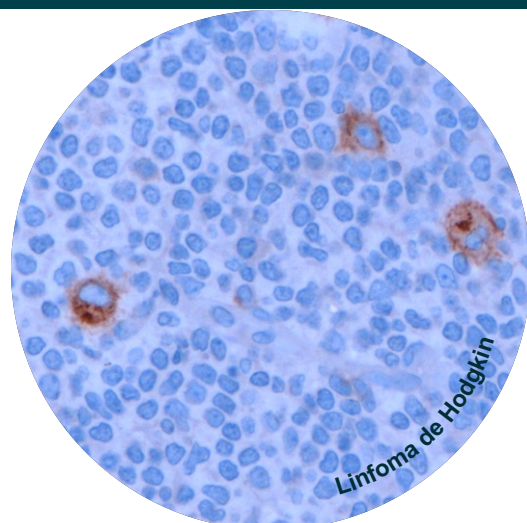
Descrição: expresso em células de Reed-Sternberg em cerca de 90% dos Linfomas de Hodgkin clássicos. A expressão pode ser de membrana, paranuclear (Golgi) ou ambas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da Amrigs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 90 min CC1
Incubação anticorpo: 60 min

Diluição
 1: 30



CC1: Cell conditioning 1, CC2: Cell conditioning 2


CD43

Clone: DF-T1, Dako

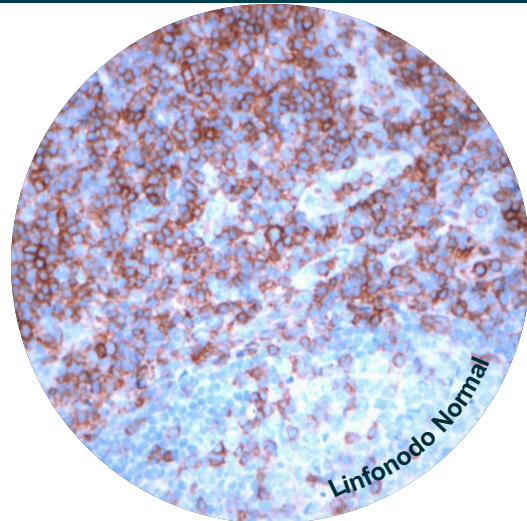
Localização: Membrana

Descrição: marcador de células T, apresentando coexpressão com marcadores B nos Linfomas B de baixo grau.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 300



Ciclina D1


Clone: SP4, Dako


Localização: Núcleo

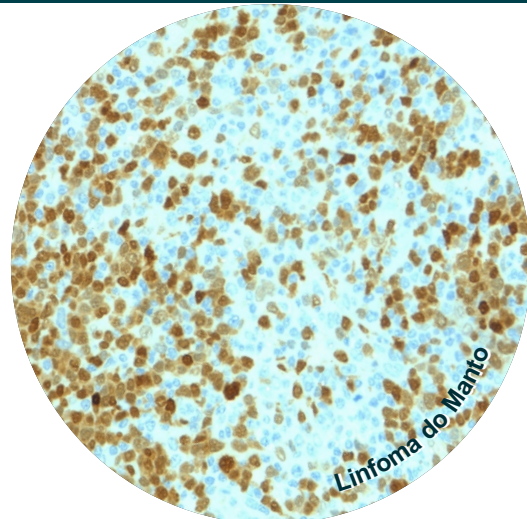
Descrição: Proteína nuclear reguladora do ciclo celular. Útil na confirmação do diagnóstico de Linfoma de células do Manto.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista de Amrigrs. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:150



IgA


Clone: N1CLA, Novocastra


Localização: Citoplasma

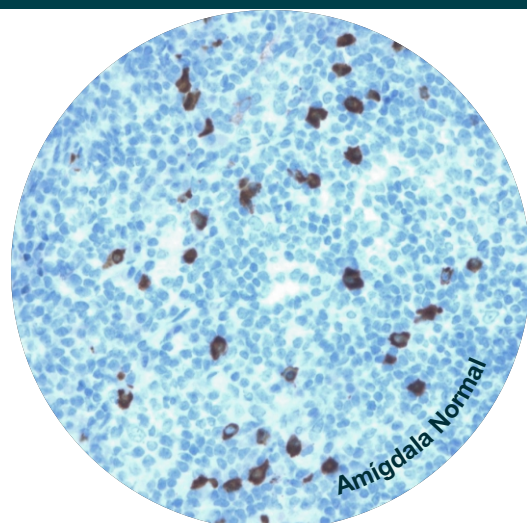
Descrição: principal imunoglobulina presente em secreções, como saliva, muco, suor, suco gástrico e lágrimas. Auxiliar na classificação de leucemias, plasmocitomas, e Linfomas de células B.

Leong AS, et al. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. Geenwich medical media Ltd. 1999. 217-219. [Acesso em 25 fev 2015]. Disponível em: http://rpatologiahfm.org/descargas/inmunohistoquimica/Manual_of_Diagnostic_Antibodies_for_Immunohistology.pdf

Teva A, Fernandez JCC, Molinaro VLS. Imunologia. Em: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4. Rio de Janeiro: EPSJV; 2010. [Acesso em 20 fev 2015]. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/ConceitosMetodos_volume4.pdf

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 200



Cc1: Cell conditioning 1

IgD

Clone: DRN1C, Novocastra

Localização: Citoplasma

Descrição: parece exercer um papel na diferenciação dos linfócitos B induzida pelo Antígeno. Auxiliar na classificação de leucemias, plasmocitomas, e Linfomas de células B.

Leong AS, et al. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. Geenwich medical media Ltd. 1999. 217-219. [Acesso em 25 fev 2015].Disponível em: http://rpatologiahmp.org/descargas/inmunohistoquimica/Manual_of_Diagnostic_Antibodies_for_Immunohistology.pdf

Teva A, Fernandez JCC, Molinaro VLS. Imunologia. Em: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4. Rio de Janeiro: EPSJV; 2010. [Acesso em 20 fev 2015]. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/ConceitosMetodos_volume4.pdf

Protocolo

Recuperação

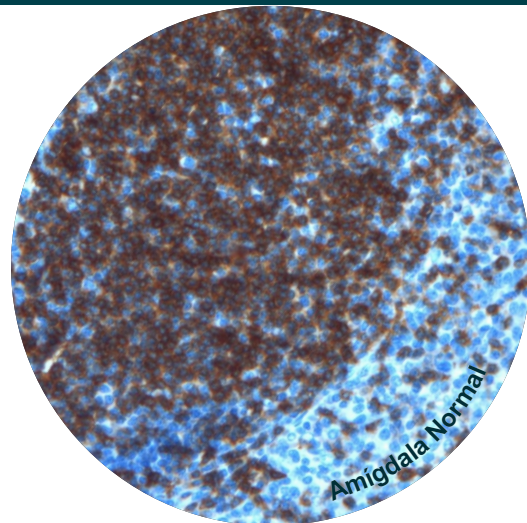
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 50



IgG

Clone: RWP49, Novocastra

Localização: Citoplasma

Descrição: principal isotipo de imunoglobulina no sangue e nos fluidos extracelulares.

Auxiliar na classificação de Leucemias, plasmocitomas, e Linfomas de células B.

Leong AS, et al. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. Geenwich medical media Ltd. 1999. 217-219. [Acesso em 25 fev 2015].Disponível em: http://rpatologiahmp.org/descargas/inmunohistoquimica/Manual_of_Diagnostic_Antibodies_for_Immunohistology.pdf

Teva A, Fernandez JCC, Molinaro VLS. Imunologia. Em: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4. Rio de Janeiro: EPSJV; 2010. [Acesso em 20 fev 2015]. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/ConceitosMetodos_volume4.pdf

Protocolo

Recuperação

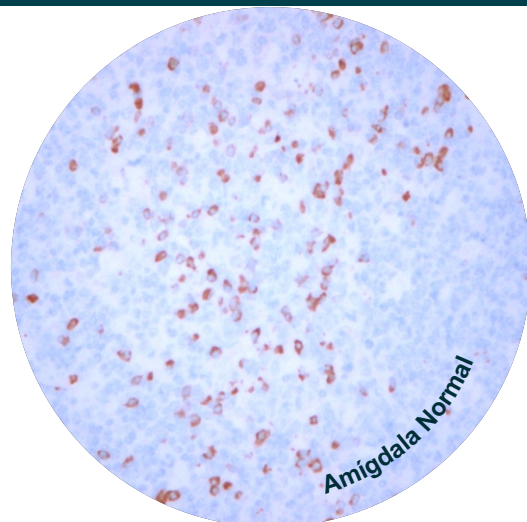
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:1000



IgM

Clone: 8H6, Novocastra

Localização: Citoplasma

Descrição: Nas fases iniciais do desenvolvimento do linfócito B, a IgM de membrana é produzida como receptor. É a primeira imunoglobulina a ser produzida numa resposta imune humoral. Auxiliar na classificação de leucemias, plasmocitomas, e Linfomas de células B.

Leong AS, et al. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. Geenwich medical media Ltd. 1999. 217-219. [Acesso em 25 fev 2015].Disponível em: http://rpatologiahmp.org/descargas/inmunohistoquimica/Manual_of_Diagnostic_Antibodies_for_Immunohistology.pdf

Teva A, Fernandez JCC, Molinaro VLS. Imunologia. Em: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4. Rio de Janeiro: EPSJV; 2010. [Acesso em 20 fev 2015]. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/ConceitosMetodos_volume4.pdf

Protocolo

Recuperação

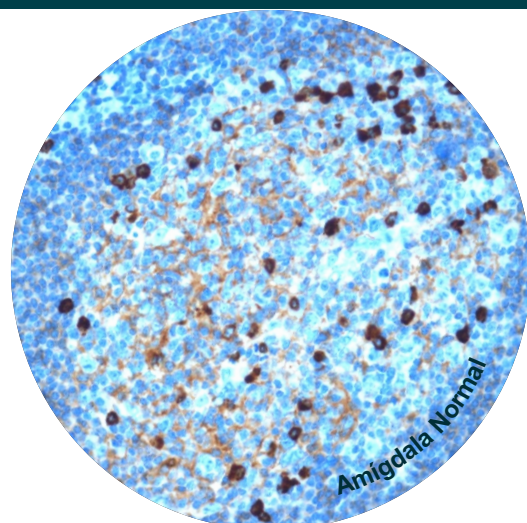
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 400



Cc1: Cell conditioning 1

Kappa Light Chains (KLC)

Clone: CH15, Novocastra

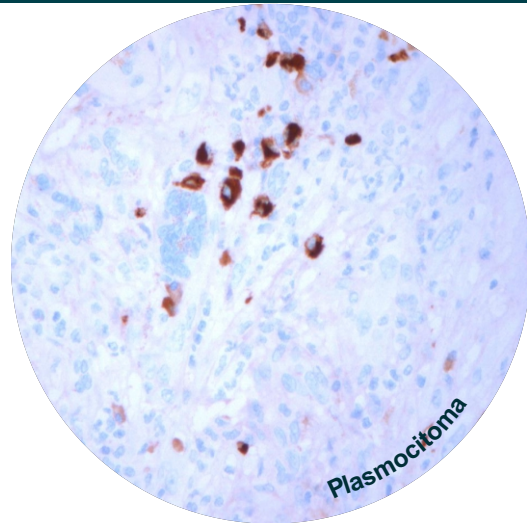
Localização: Citoplasma

Descrição: A avaliação clonalidade de células B pode ser realizada por meio da expressão das cadeias leves Kappa e Lambda.

Rimsza LM, Day WA, McGinn S, Pedata A, Natkunam Y, Warnke R, et al. Kappa and lambda light chain mRNA in situ hybridization compared to flow cytometry and immunohistochemistry in B cell lymphomas. *Diagnostic Pathology* 2014 Jul, 9 (144):1-8.

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 2000



Antígeno Leucocitário Comum (LCA)

Clone: 2B11+PD7/26, Dako

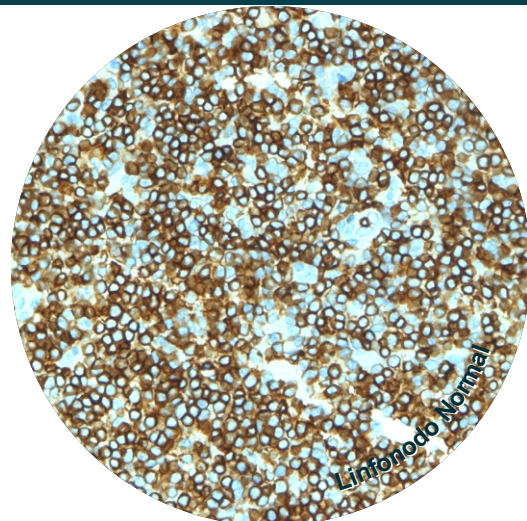
Localização: Membrana

Descrição: identifica uma glicoproteína transmembrana expressa em todas as células hematolinfóides e seus precursores.

Barra, MB. O uso da imunistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da Amrigs*. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 500



Lambda Light Chains (LLC)

Clone: SHL53, Novocastra

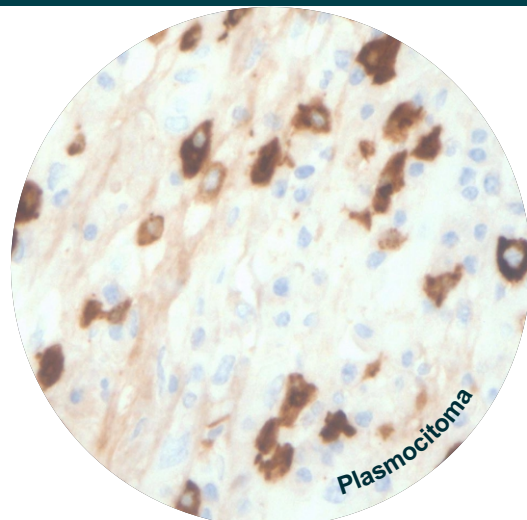
Localização: Citoplasma

Descrição: A identificação de cadeias leves monotípicas é um importante auxiliar para o diagnóstico de Linfoma de células B.

Weiss LM, Loera S, Bacchi CE. Immunoglobulin light chain immunohistochemistry revisited, with emphasis on reactive follicular hyperplasia versus follicular lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010 May; 18(3):199-205

Protocolo
Recuperação
Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:2000



Cc1: Cell conditioning 1

OCT2

Clone: Policlonal, Abcam

Localização: Núcleo

Descrição: (Octamer-Binding Transcription factor 2) Octâmero de ligação de fator de transcrição 2 expresso apenas nos linfócitos B e nas células neuronais.

Latchman DS. The Oct-2 transcription factor. Int J Biochem Cell Biol. 1996 Oct; 28(10):1081-3.

Protocolo
Recuperação



Antigênica: 90 min CC1

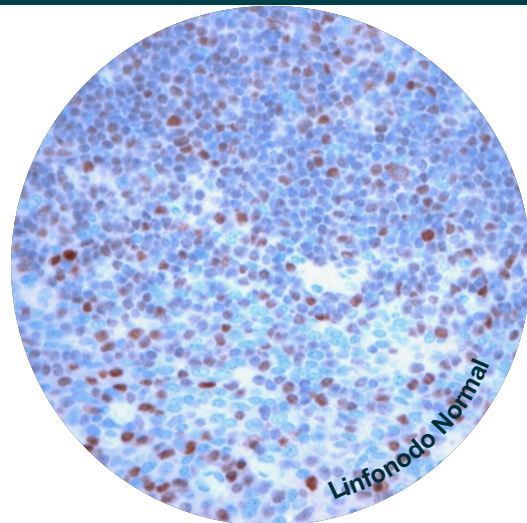
Incubação anticorpo: 90 min



Diluição

1: 50*

* Uso de amplificador



TDT

Clone: SEN28, Novocastra

Localização: Núcleo

Descrição: é uma polimerase do DNA. Mostra positividade para células precursoras B e T. Auxiliar no diagnóstico de Linfoma linfoblástico.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação



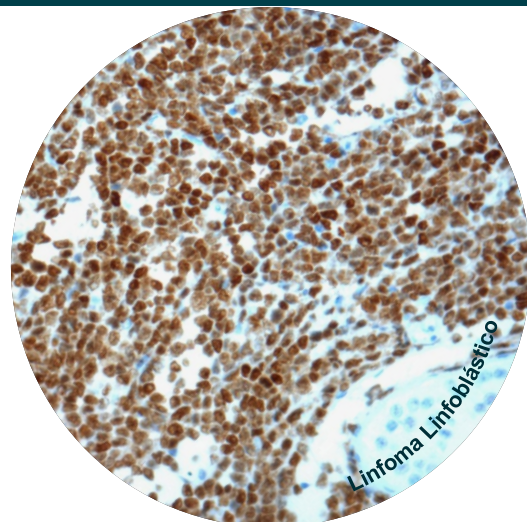
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:200



ZAP70

Clone: 2F3.2, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: é uma tirosina-quinase que participa na diferenciação das células-B sendo um fator prognóstico na Leucemia linfocítica crônica.

Carreras J, Villamor N, Colomo L, Moreno C, Ramón y Cajal S, Crespo M, et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. J Pathol. 2005 Mar;205(4):507-13.

Protocolo
Recuperação



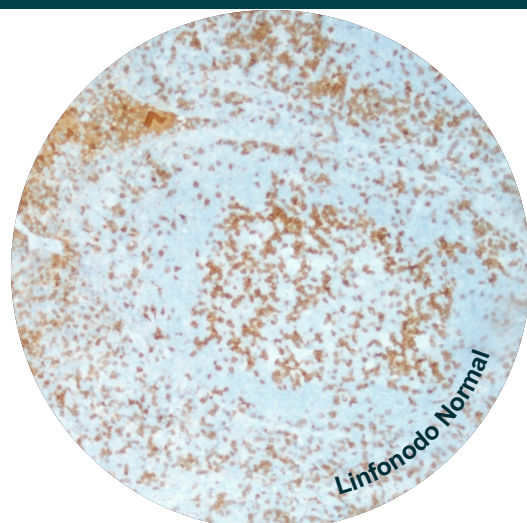
Antigênica: 90 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



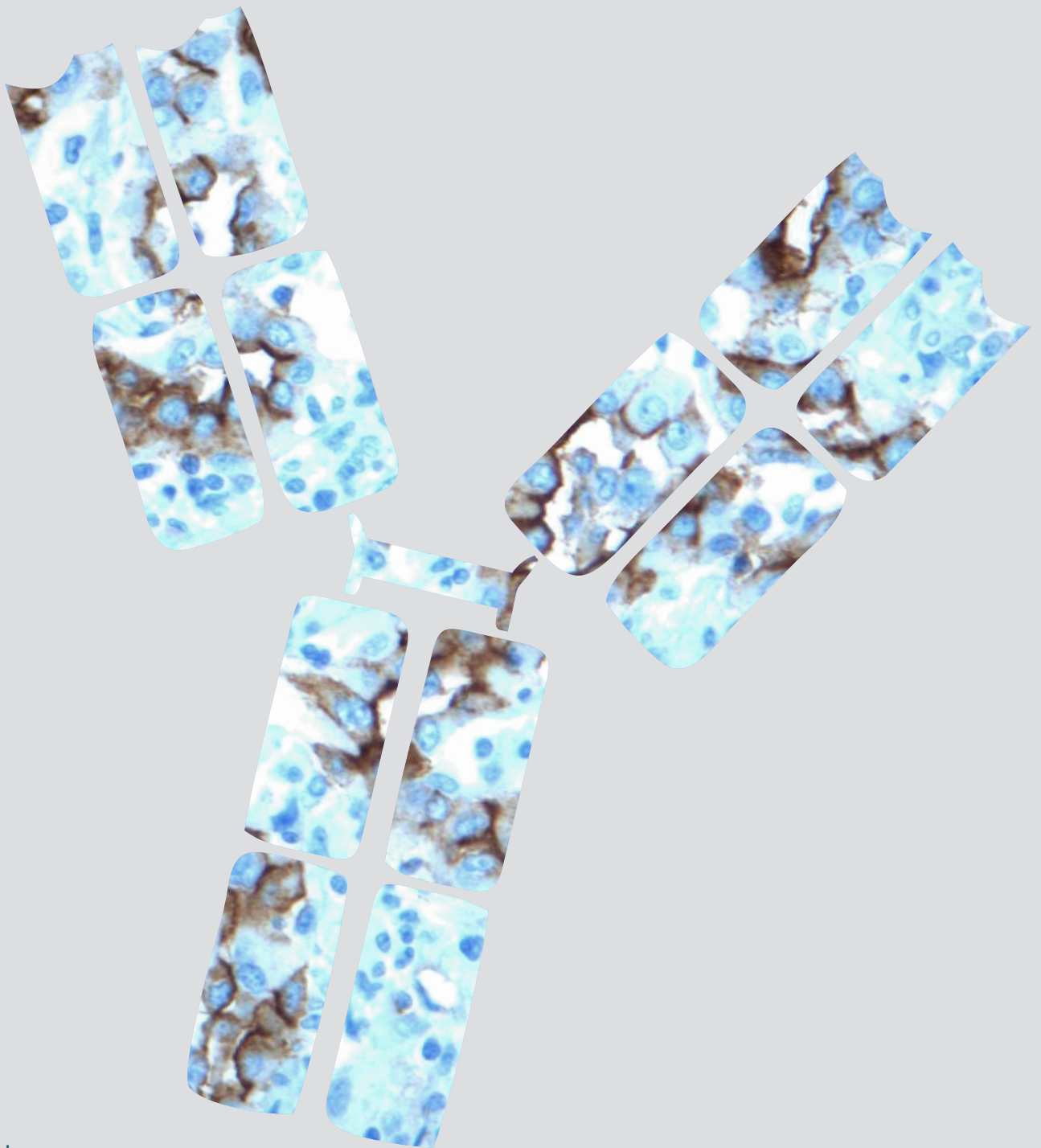
Diluição

1: 50



Cc1: Cell conditioning 1

Marcadores de Mesotelioma




Calretinina


Clone: DAK Calret1, Dako

Localização: Citoplasma/Núcleo

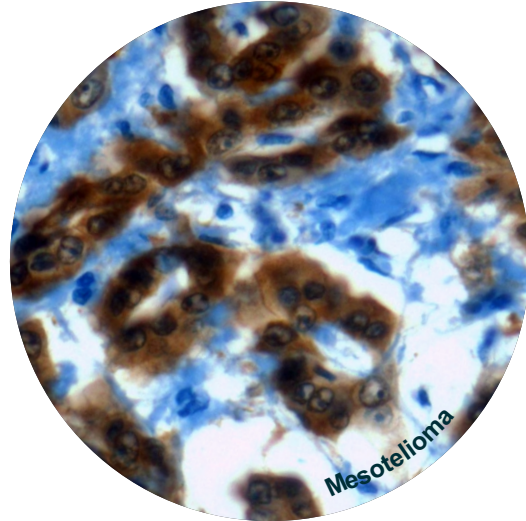
Descrição: proteína ligadora de cálcio expressa em mesotélio e epitélio.

Rosai J, Ackerman's Surgical Pathology LV.. 9th ed. Mosby: Edinburgh, 2004.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 90 min CC1
Incubação anticorpo: 90 min

Diluição
 **1: 25***

* Uso de amplificador




Célula Mesotelial


Clone: HBME-1, Dako

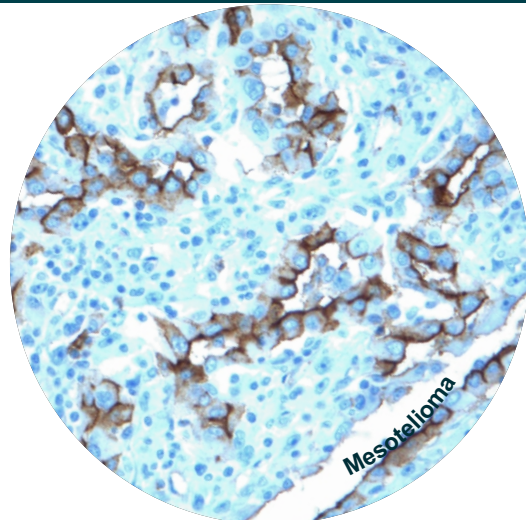
Localização: Membrana

Descrição: marcador de células mesoteliais normais, está presente na maior parte dos mesoteliomas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

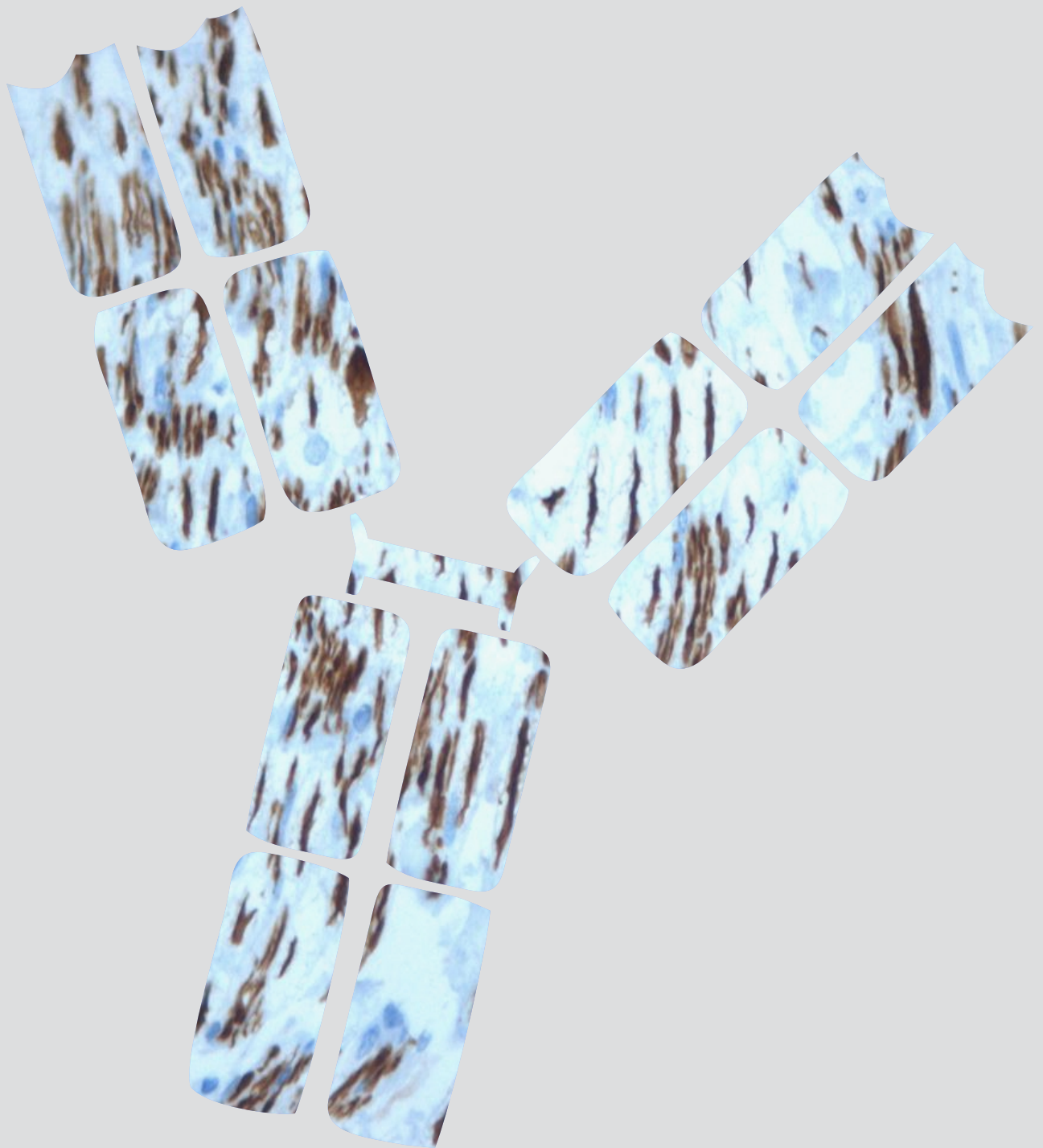
Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 90 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 **1:100**



Cc1: Cell conditioning 1

Marcadores Neuroendócrinos



CD57

Clone: TB01, Dako

Localização: Membrana

Descrição: desenvolvido como marcador de células Natural-Killer, também é útil como marcador neuroendócrino.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação



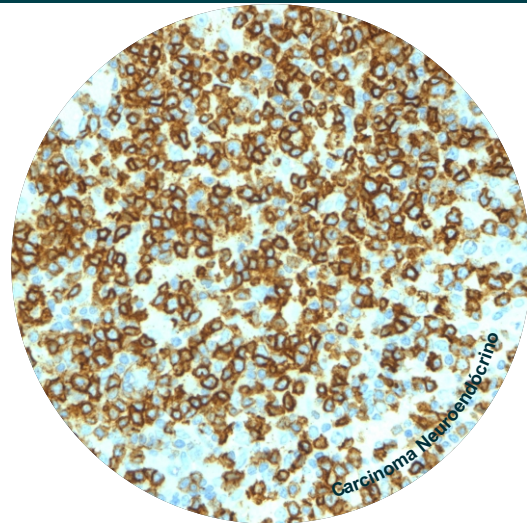
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 100



Cromogranina

Clone: DAK-A3, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: proteína componente de grânulos secretórios de células endócrinas e neurônios útil na diferenciação neuroendócrina.

4. Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação



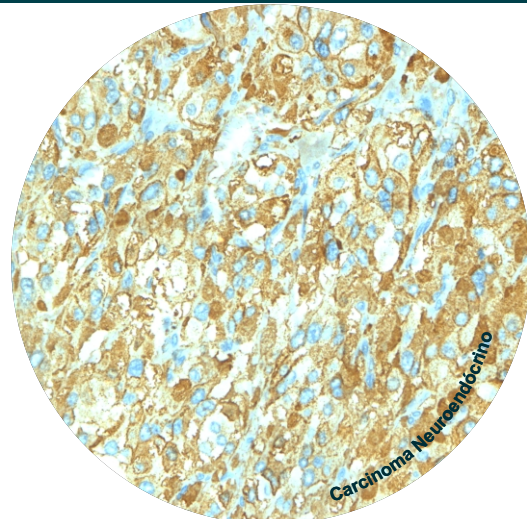
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:250



Enolase

Clone: BBS/NC/VI-H14, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: utilizada como marcador neuroendócrino.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação



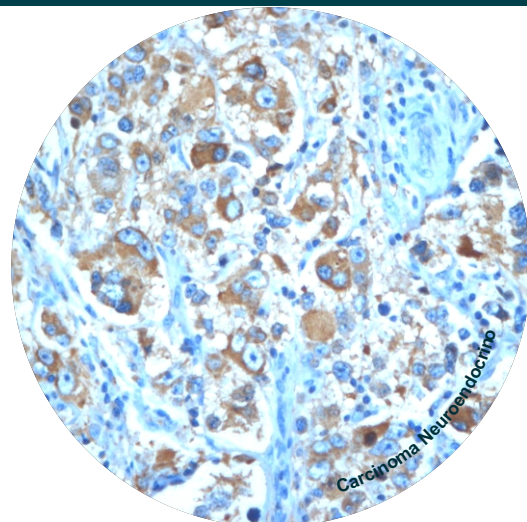
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 500



*CC1: Cell conditioning 1


Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Clone: 6F2, Dako

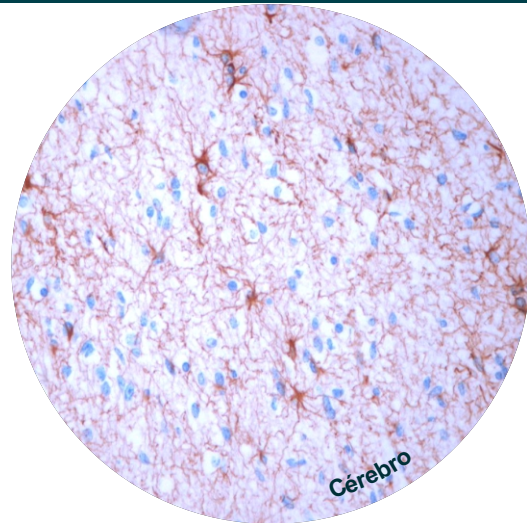
Localização: Citoplasma

Descrição: filamento intermediário de astrócitos normais, reativos e neoplásicos.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

 **Diluição**
 1: 500




Glucagon


Clone: Policlonal, Dako

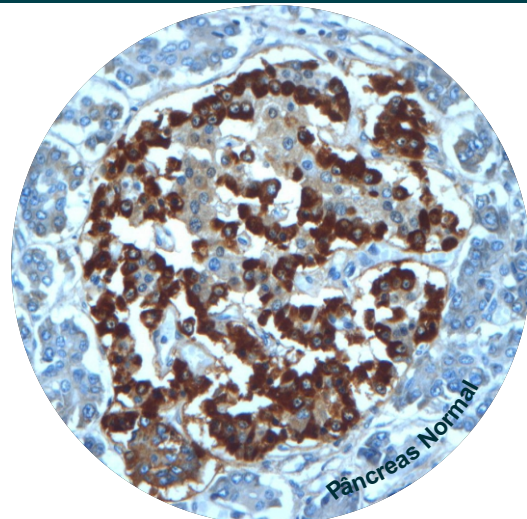
Localização: Citoplasma

Descrição: produzido pelas células alfa, correspondem a 20% das células nas ilhotas pancreáticas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** Não necessário
Incubação anticorpo: 32 min

 **Diluição**
 1:200




Insulina


Clone: Policlonal, Dako

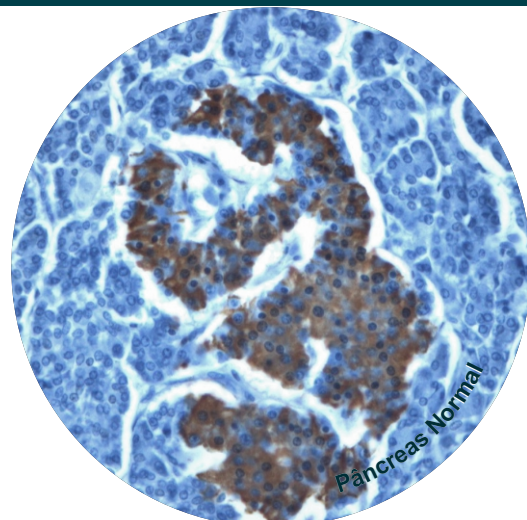
Localização: Citoplasma

Descrição: produzida pela células beta do pâncreas, correspondem de 60 a 80% das células das ilhotas pancreáticas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** Não necessário
Incubação anticorpo: 32 min

 **Diluição**
 1: 300



*CC1: Cell conditioning 1

Neurofilamento (NFP)

Clone: 2F11, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: filamento intermediário presente no citoesqueleto de todas as células neurais. Pode ser utilizado para discriminar neoplasias que se originam deste tipo celular. As células tumorais geralmente retêm as proteínas de filamento intermediário típicos de suas células de origem.

Ramaekers FC. Application of monoclonal antibodies to intermediate filament proteins in surgical pathology of head and neck tumours. An overview. Appl Pathol. 1988; 6(1):35-48.

Mukai M, Torikata C, Iri H, Morikawa Y, Shimizu K, Shimoda T, ET al. Expression of neurofilament triplet proteins in human neural tumors. An immunohistochemical study of paraganglioma, ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma, and neuroblastoma. Am J Pathol 1986;122(1):28-35.

**Protocolo
Recuperação**



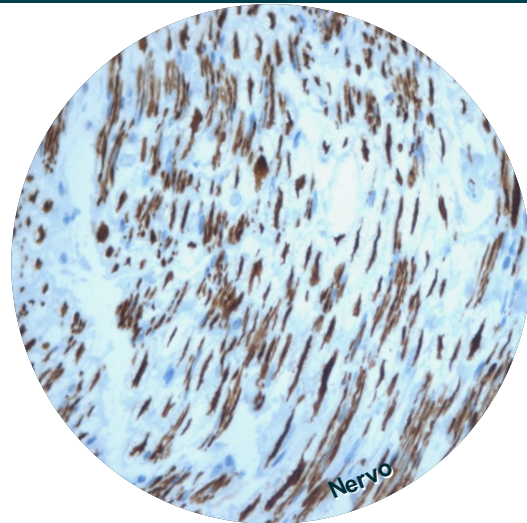
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 50



Sinaptofisina

Clone: sy-38, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: proteína ligadora de cálcio presente nas vesículas pré-sinápticas dos neurônios e grânulos neurosecretórios das células neuroendócrinas, auxiliar como marcador de diferenciação neuroendócrina.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

**Protocolo
Recuperação**



Antigênica: 90 min CC1

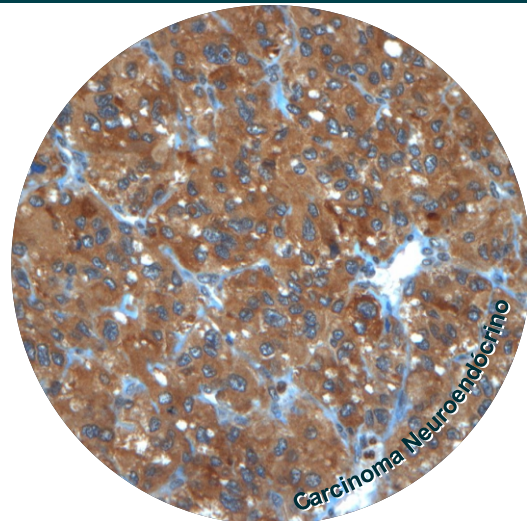
Incubação anticorpo: 90 min

*Uso de amplificador



Diluição

1:50*



Somatostatina

Clone: Policlonal, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: produzida pelas células delta do pâncreas, correspondem de 5 a 15% do total de células endócrinas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

**Protocolo
Recuperação**



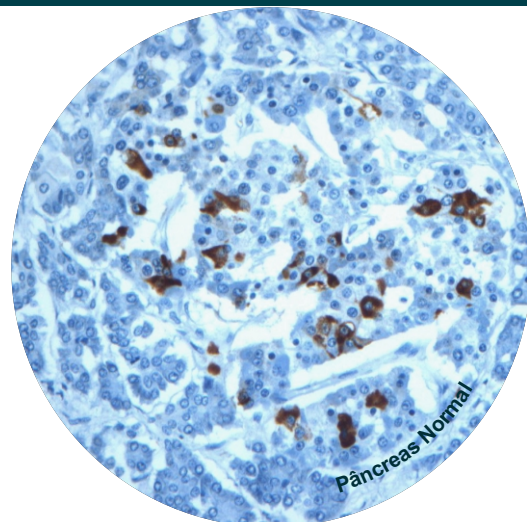
Antigênica: Não necessário

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 400



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores de Próstata





Antígeno Específico da Próstata (PSA)

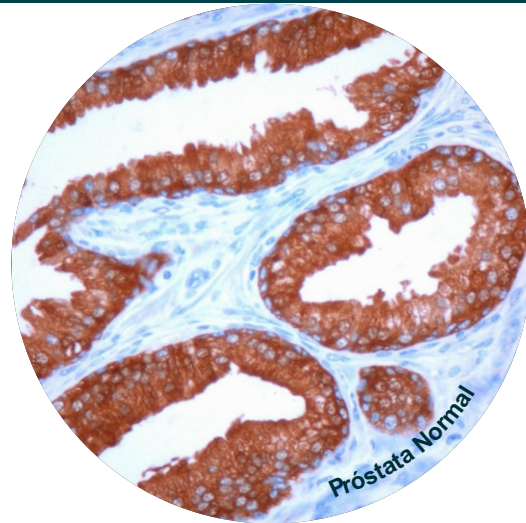
Clone: ER-PR8, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: marca o epitélio prostático e seus carcinomas. Considerado um marcador órgão-específico, pois sua expressão não tem sido relatada em carcinomas de origem não prostática.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

<p>Protocolo Recuperação</p> <p> Antigênica: Não necessário Incubação anticorpo: 32 min</p>	<p> Diluição</p> <p>1: 100</p>
--	--





Antígeno de membrana específico da próstata (PSMA)

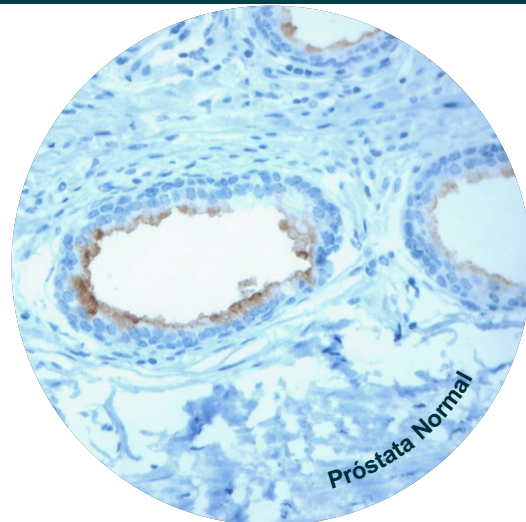
Clone: 3E6, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: Antígeno de membrana específico da próstata é abundante no câncer de próstata.

Osborne JR, Akhtar NH, Vallabhajosula S, Anand A, Deh K, Tagawa ST. Review article: Prostate-specific membrane antigen-based imaging. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. 2012. 1-11.

<p>Protocolo Recuperação</p> <p> Antigênica: 90 min CC1 Incubação anticorpo: 90 min</p>	<p> Diluição</p> <p>1:200</p>
--	---





Racemase

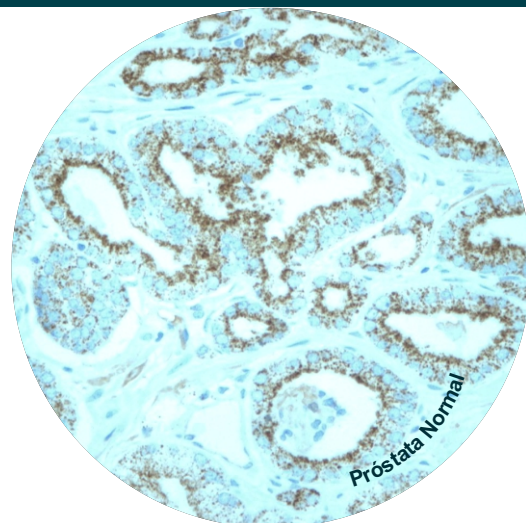
Clone: EPMU1, Novocastra

Localização: Citoplasma

Descrição: enzima mitocondrial e peroxisomal. Geralmente superexpressa em adenocarcinoma de próstata.

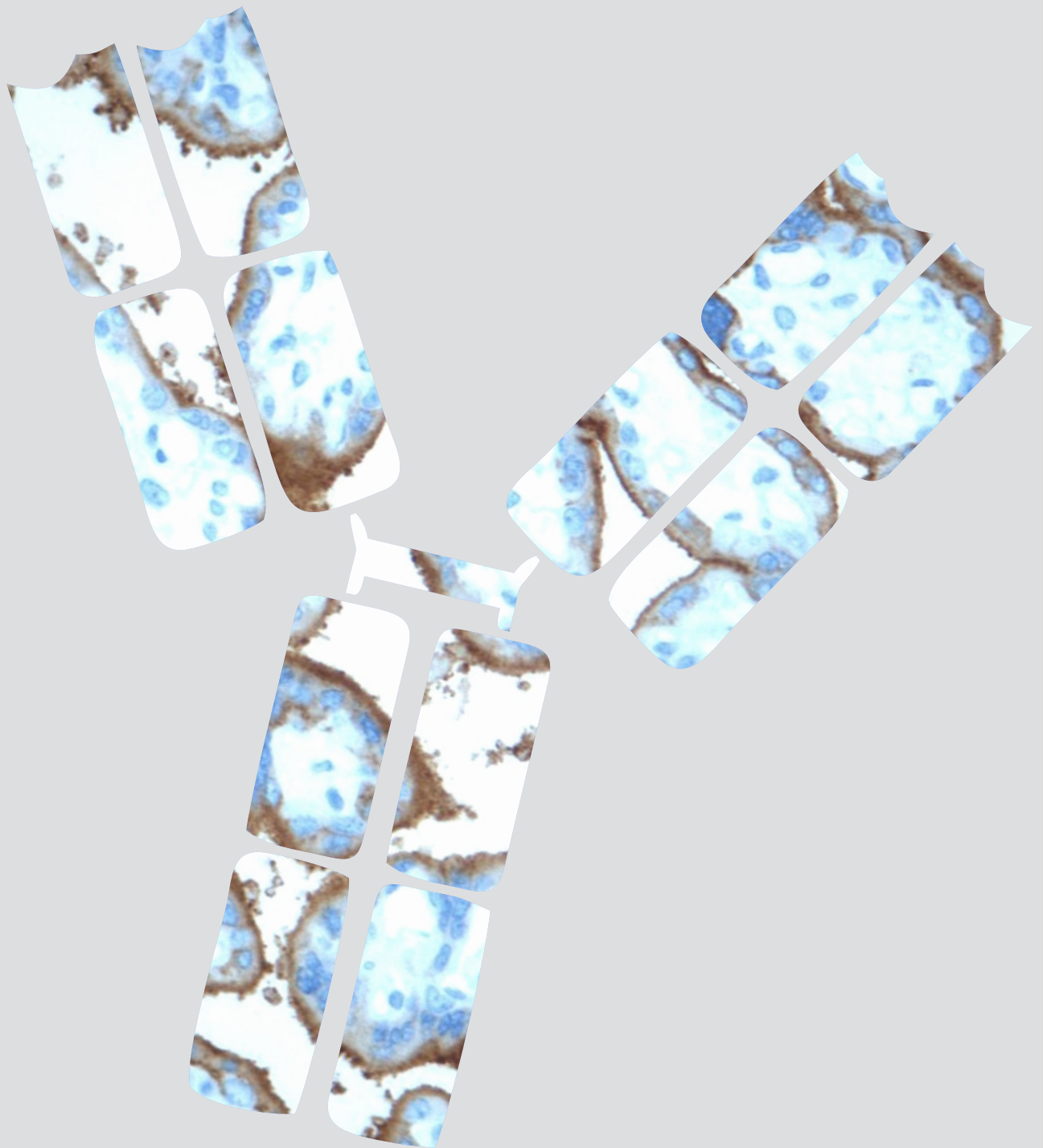
Rosai J, Ackerman's Surgical Pathology LV.. 9th ed. Mosby: Edinburgh, 2004.

<p>Protocolo Recuperação</p> <p> Antigênica: 60 min CC1 Incubação anticorpo: 32 min</p>	<p> Diluição</p> <p>1: 100</p>
--	--



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores de Neoplasia de Células Germinativas



Alfa feto proteína

Clone: Policlonal, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: proteína oncofetal, presente em tumores de células germinativas com diferenciação para saco vitelínico.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação

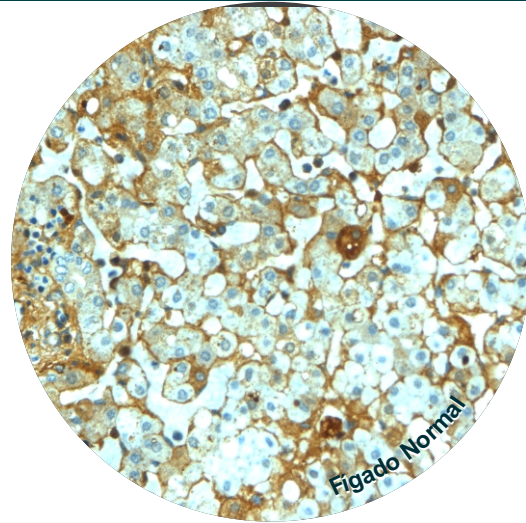


Antigênica: Não necessário
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 50



Gonadotropina coriônica (HCG)

Clone: Policlonal, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: marcador de diferenciação sinciotrofoblástica em tumores de células germinativas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação

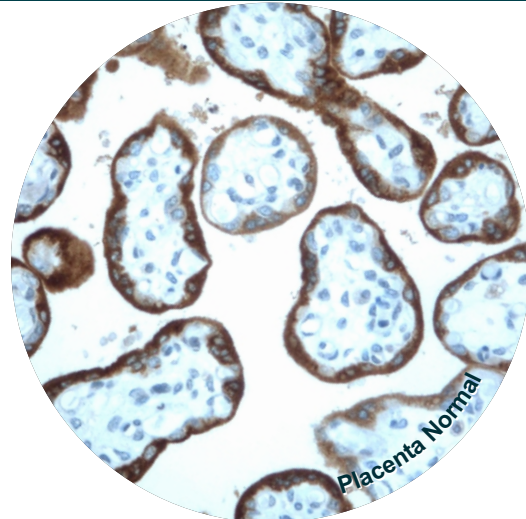


Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1:4000



Fosfatase alcalina placentária (PLAP)

Clone: 8A9, Dako

Localização: Citoplasma

Descrição: Em tecidos normais é expressa nos sinciotrofoblastos da placenta. Positiva em toda a gama de neoplasias de células germinativas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Millán JL, Fishman WH. Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. Crit Rev Clin Lab Sci. 1995;32(1):1-39.

Protocolo
Recuperação

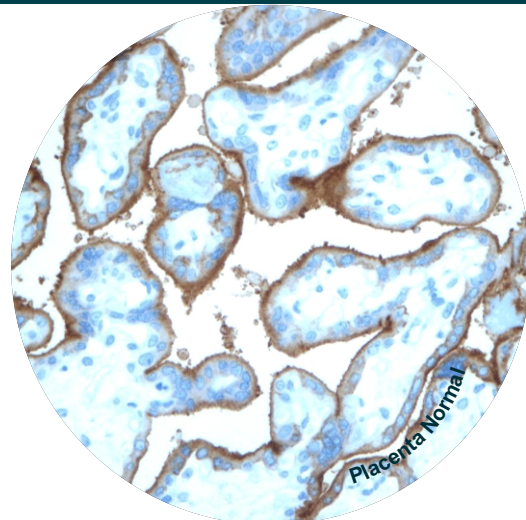


Antigênica: 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min



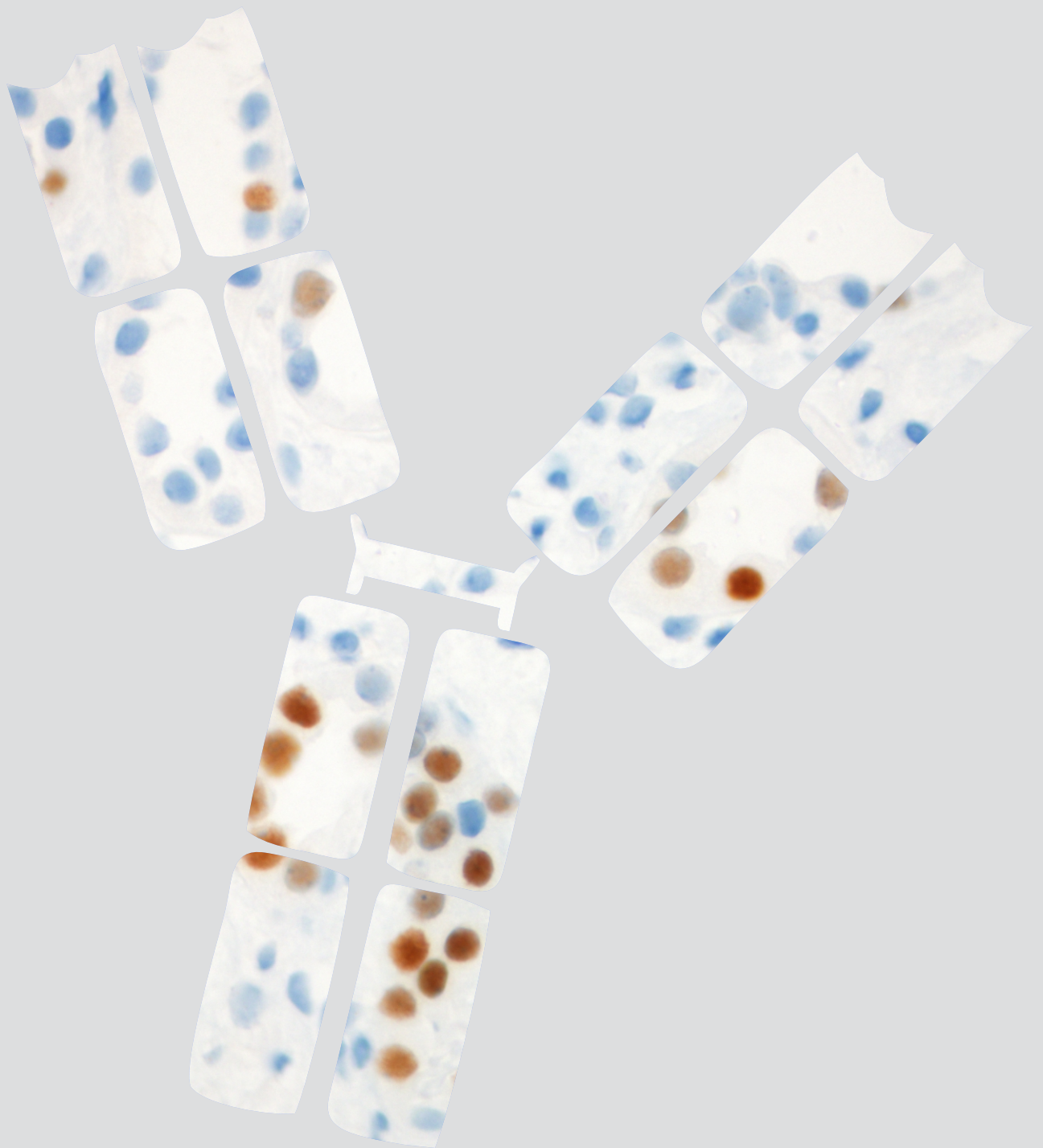
Diluição

1: 100



*CC1: Cell conditioning 1

Marcadores Virais




Citomegalovírus (CMV)


Clone: CCH2+DDG9, Dako

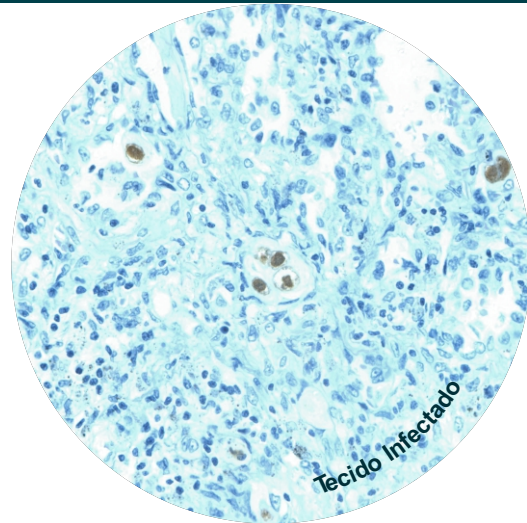
Localização: Núcleo

Descrição: utilizado no diagnóstico de pacientes imunocomprometidos, onde não se encontram as lesões intranucleares características em olho de coruja.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 4 min Protease I
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 800




Epstein-Barr vírus (EBV)

Clone: CS.1-4, Dako

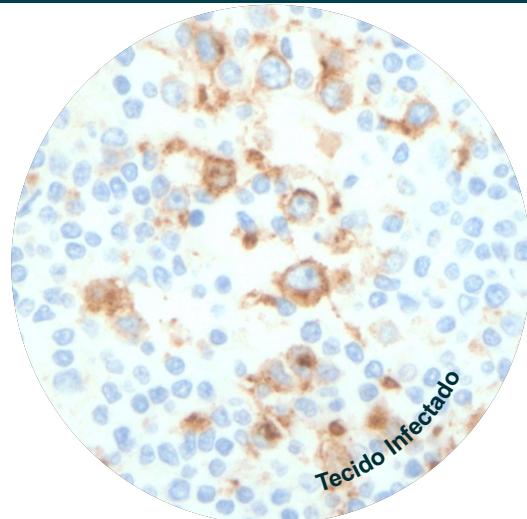
Localização: Citoplasma

Descrição: específico para a 'proteína da membrana latente' (LMP), do vírus de Epstein-Barr, uma das proteínas efetoras de transformação de células B induzida pelo EBV.

Rowe M, Evans HS, Young LS, Hennessy K, Kieff E, Rickinson AB. Monoclonal antibodies to the latent membrane protein of Epstein-Barr virus reveal heterogeneity of the protein and inducible expression in virus-transformed cells. J Gen Virol. 1987 Jun;68 (Pt 6):1575-86.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:600




Herpes vírus tipo 8 (HHV8)

Clone: LN35, Abcam

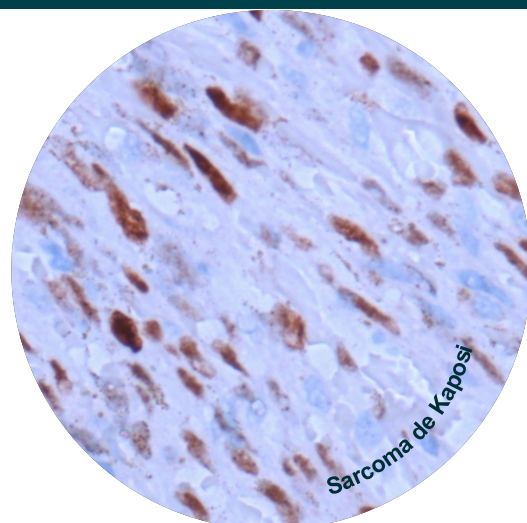
Localização: Núcleo

Descrição: Herpes Vírus Humano 8 também pode ser denominado Sarcoma de Kaposi Herpes Vírus (KSHV) é o agente infeccioso de importância etiológica no desenvolvimento do Sarcoma de Kaposi.

Leão JC, Hinrichsen SL, de Freitas BL, Porter SR. Herpes vírus humano-8 e Sarcoma de Kaposi. Rev Assoc Med Bras. 1999Jan/Mar; 45 (1).

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 90 min
 *Uso de amplificador

Diluição
 1: 50*



*CC1: Cell conditioning 1

Polioma vírus

Clone: Pab416, Calbiochem

Localização: Núcleo

Descrição: o genoma viral é frequentemente detectado em rins saudáveis, logo o doador de órgãos pode ser importante veículo de transmissão do vírus. As reativações do vírus são induzidas por imunossupressão significativa.

Pires, Elizabete Pereira . Prevalência da infecção pelos Polyomavirus JC e BK em Pacientes com Doença Renal Crônica e Transplantados. [Dissertação] Belém, Pará, 2009, 89p

Protocolo
Recuperação



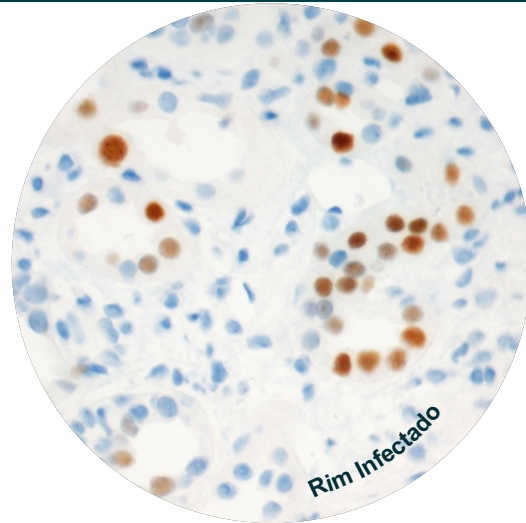
Antigênica: 60 min CC1

Incubação anticorpo: 32 min



Diluição

1: 500



Outros Marcadores




C4d

Clone: A213, Quidel

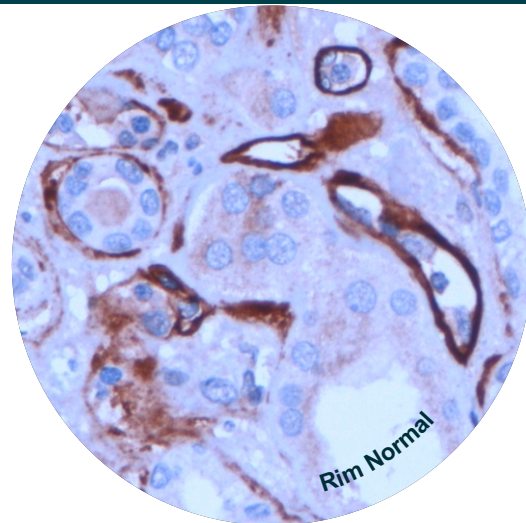
Localização: Membrana/Citoplasma

Descrição: Deposição de C4d em capilares peritubulares de enxerto renal é normalmente associada com a presença de rejeição mediada por anticorpos.

Pedraza N, Girón F, Baez Y, Niño A, Rodríguez J, Orozco C. Positive C4d in kidney transplantation biopsy: clinical impact. Transplant Proc. 2014 Nov;46(9):2966-71

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 10




Calcitonina


Clone: CL1948, Novocastra

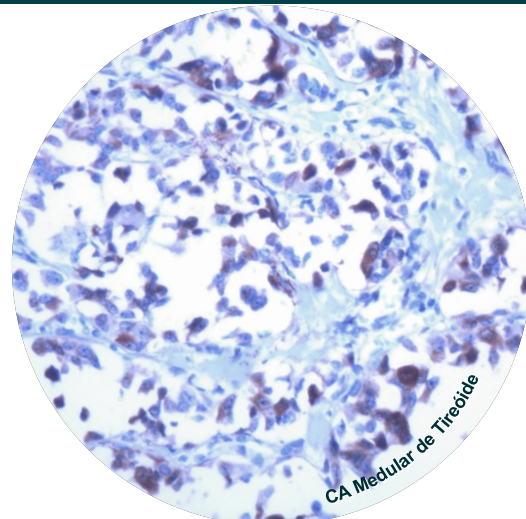
Localização: Citoplasma

Descrição: as células C da tireóide sintetizam calcitonina. O marcador é útil na identificação da hiperplasia de células C, e no diagnóstico diferencial entre carcinoma medular e folicular da tireóide.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 4 min Protease I
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 300




CD99


Clone: 12-E7, Dako

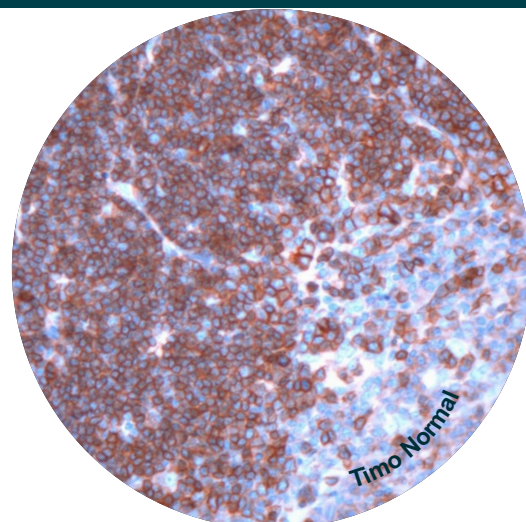
Localização: Membrana

Descrição: presente nos sarcomas de Ewing e na maioria dos tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos (PNETs).

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 100



*CC1: Cell conditioning 1


Colágeno IV

Clone: CIV, Dako

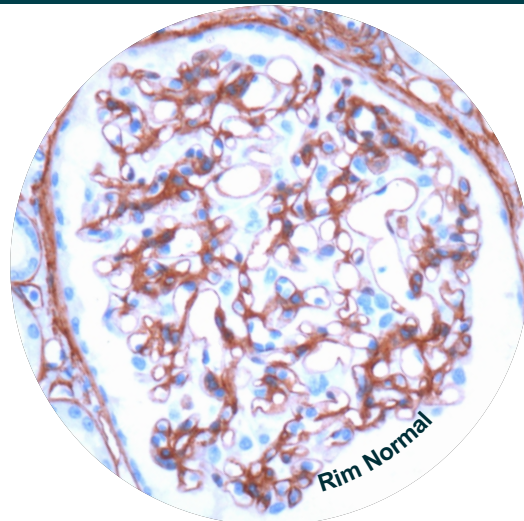
Localização: Membrana

Descrição: presente na membrana basal, é útil na distinção de carcinoma *in situ* e carcinoma microinvasivo.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 90 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 100




Hepatocyte


Clone: OCH1E5, Dako

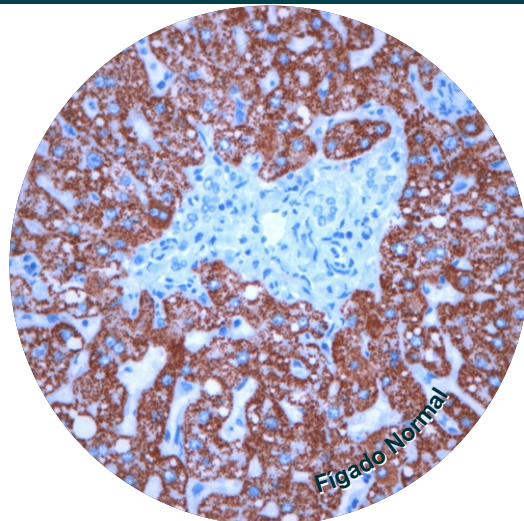
Localização: Citoplasma

Descrição: (HepPar 1) altamente específico para hepatócitos benignos e malignos é útil para o diagnóstico diferencial de tumores hepatocelulares.

Minervini MI, Demetris AJ, Lee RG, Carr BI, Madariaga J, Nalesnik MA. Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. Mod Pathol. 1997 Jul;10(7):686-92.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1:300




Napsina

Clone: 01-0221, ARP

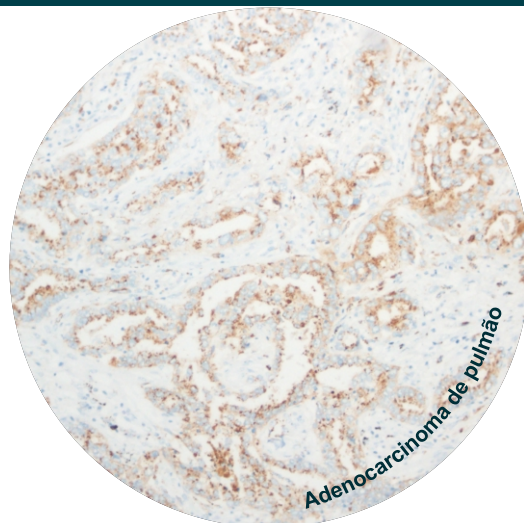
Localização: Citoplasma

Descrição: Marcador com maior sensibilidade que TTF1 na detecção de adenocarcinoma primário de pulmão.

Ye J, Findeis-Hosey JJ, Yang Q, McMahon LA, Yao JL, Li F, et al. Combination of napsin A and TTF-1 immunohistochemistry helps in differentiating primary lung adenocarcinoma from metastatic carcinoma in the lung. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2011 Jul;19(4):313-7

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 500



*CC1: Cell conditioning 1


Podoplanina (D240)

Clone: D240, Dako

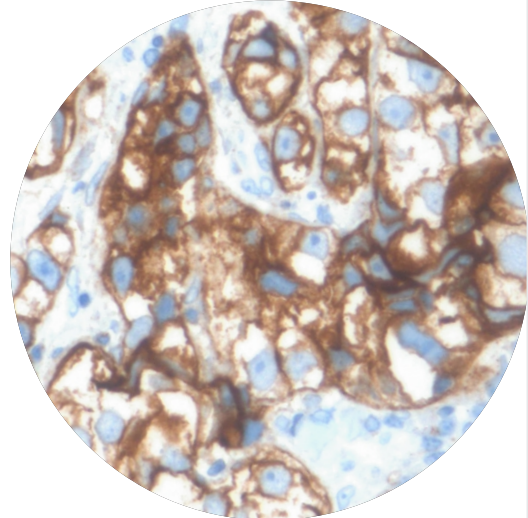
Localização: Membrana/Citoplasma

Descrição: mucoproteína transmembranar expressa em células endoteliais linfáticas normais. É útil para o estudo de lesões vasculares.

D2-40 Immunohistochemistry—So Far! *Advances in Anatomic Pathology*. 2009 Jan; 16(1):62-64.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 90 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 25




Vimentina

Clone: V9, Dako

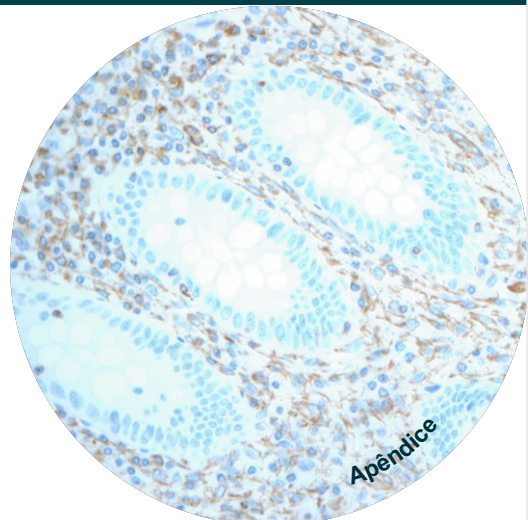
Localização: Citoplasma

Descrição: filamento intermediário típico das células mesenquimais auxilia no diagnóstico de sarcomas.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. *Manual de Imunohistoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 60 min CC1
Incubação anticorpo: 32 min

Diluição
 1: 2000




WILMS tumor 1 (WT1)


Clone: 6FH2, Dako

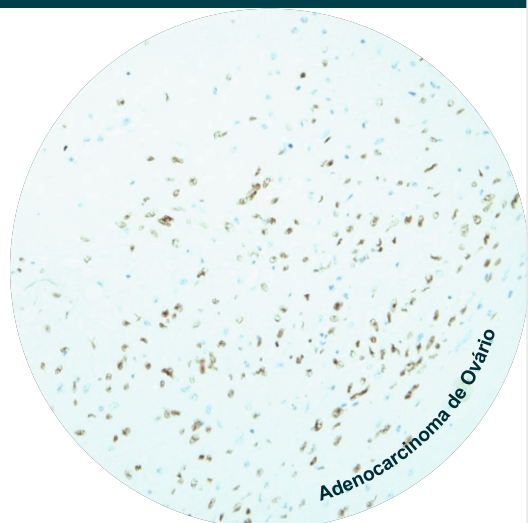
Localização: Núcleo

Descrição: originado do gene supressor tumoral do tumor de wilms, desempenha papel no desenvolvimento do trato genitourinário e está expresso em tecidos como células superficiais do epitélio ovariano.

Barra, MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da Amrigs*. Abr-Jun 2006; 50(2): 173-184.

Protocolo
Recuperação
 **Antigênica:** 8 min Protease I
Incubação anticorpo: 90 min

Diluição
 1: 50



*CC1: Cell conditioning 1

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Padronização dos protocolos de marcadores imuno-histoquímicos para uso em plataforma de automação

Pesquisador: Claudio Galleano Zettler

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 10653613.0.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 332.213

Data da Relatoria: 11/07/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional prospectivo, realizado no LABORATÓRIO DE PATOLOGIA do COMPLEXO HOSPITALAR SANTA CASA. Serão selecionados anticorpos concentrados que compõem os painéis imuno-histoquímicos mais utilizados na rotina diagnóstica do laboratório para que sejam testados na plataforma de automação BENCHMARK. Serão selecionados, ainda, 50 amostras de material biológico provenientes de peças cirúrgicas oriundas do COMPLEXO HOSPITALAR SANTA CASA DE PORTO ALEGRE, retirados de pacientes para realização de exame anatomicopatológico e exame imuno-histoquímico, para o teste destes protocolos.

Objetivo da Pesquisa:

Padronizar protocolos de marcadores imuno-histoquímicos concentrados de fabricantes diversos para a utilização em automação no equipamento BENCHMARK XT da VENTANA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem riscos. Benefícios: padronização de técnica de imuno-histoquímica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequada.

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303 -8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 332.213

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados. As alterações solicitadas na primeira análise do presente projeto foram realizadas a contento pelos autores.

Recomendações:

Aprovar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o Parecer do relator.

PORTO ALEGRE, 12 de Julho de 2013

Assinador por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303 -8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br