

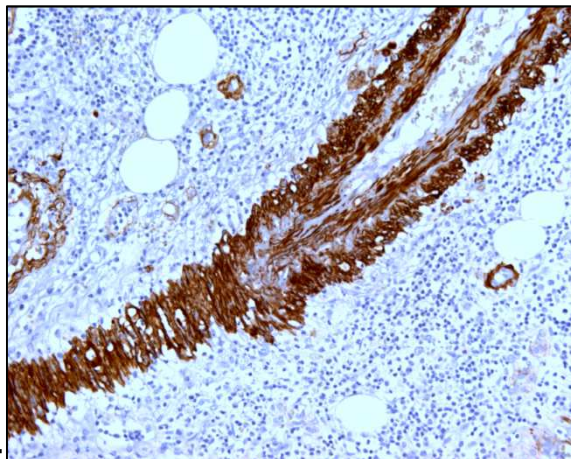
- Instituto Politécnico de Lisboa -
- Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa -



**AMPLIFICAÇÃO EM IMUNOHISTOQUÍMICA:
ESTUDO COMPARATIVO DE SISTEMAS DE POLÍMEROS**

Autor

Amadeu Borges Ferro



Trabalho de Natureza Profissional para Discussão em Provas Públicas para Atribuição do
Título de Especialista de acordo com o Decreto-Lei 206/2009 de 31 de Agosto

Dezembro de 2011

Amadeu Borges Ferro

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

Av. D. João II, Lote 4.69.01 1990-096 Lisboa - Portugal

Tel: +351218980459 Tlm: +351962922469

amadeu.ferro@estesl.ipl.pt

Imagem de Capa: imunomarcção para actina do músculo liso (HRP/DAB; ampliação 100x)

A maior alegria neste mundo é a de começar. É belo viver, porque viver é começar, sempre, a cada instante... A lição é sempre a mesma: atirarmo-nos para a frente e saber suportar o castigo. É melhor sofrer por ter ousado agir a sério do que recuar. É, de resto, a Natureza que o quer e recuar é cobardia. No fim, já se tem visto, paga-se mais caro.

Cesare Pavese, in "*O Ofício de Viver*"

Escritor, 1908-1950

Agradecimento

À Colega Ana Margarida Rodrigues que colaborou ativamente na preparação deste trabalho.

Às empresas que cederam os seus sistemas de amplificação para o estudo: Baptista Marques Diagnóstica e Reagentes Lda., Inopat, Labometer - sociedade técnica de equipamentos de laboratório e Menarini Diagnósticos Portugal.

Ao Amigo Mário Maia Matos, que teve a paciência de rever todo o trabalho escrito, agradeço todo o inesgotável apoio e incentivo.

Resumo

Desde o início da utilização da imunohistoquímica em anatomia patológica, um dos objetivos tem sido detetar as quantidades mais ínfimas de antigénio, tornando-o visível ao microscópio ótico. Vários sistemas de amplificação têm sido aplicados de forma a concretizar este objetivo, tendo surgido um grupo genérico de métodos simples e que apresentam uma amplificação superior: são os denominados métodos do polímero indireto. Tendo em conta a variedade de métodos disponíveis, o autor propõe-se a comparar a qualidade de quatro sistemas de amplificação, que recorrem ao método do polímero indireto com *horseradish peroxidase* (HRP). Foram utilizadas lâminas de diferentes tecidos, fixados em formol e incluídos em parafina, nos quais se procedeu à identificação de 15 antigénios distintos. Na amplificação recorreu-se a quatro sistemas de polímero indireto (Dako EnVision+ System – K4006; LabVision UltraVision LP Detection System – TL-004-HD; Leica NovoLink – RE7140-k; Vector ImmPRESS Reagent Kit – MP-7402). A observação microscópica e classificação da imunomarcação obtida foram feitas com base num algoritmo que enquadra intensidade, marcação específica, marcação inespecífica e contraste, num *score* global que pode tomar valores entre 0 e 25. No tratamento dos dados, para além da estatística descritiva, foi utilizado o teste *one-way* ANOVA com *post-hoc* de tukey ($\alpha=0.05$). O melhor resultado obtido, em termos de par média/desvio-padrão, dos *scores* globais foi o do NovoLink (22,4/2,37) e o pior foi o do EnVision+ (17,43/3,86). Verificou-se ainda que existe diferença estatística entre os resultados obtidos pelo sistema NovoLink e os sistemas UltraVision ($p=.004$), ImmPRESS ($p=.000$) e EnVision+ ($p=.000$). Concluiu-se que o sistema que permitiu a obtenção de melhores resultados, neste estudo, foi o Leica NovoLink.

Palavras-chave: Imunohistoquímica, amplificação, polímero.

Abstract

Since the beginning of the use of immunohistochemistry in pathology, one of the aims has been to detect the smallest amounts of antigen, making it visible to the optical microscope. Several amplification systems have been applied in order to achieve this goal and a generic group of simple methods with higher amplification came up, known as indirect polymer methods. Given the diversity of available methods, the author proposes to compare the quality of four amplification systems, which use the indirect polymer method with horseradish peroxidase (HRP). Several slides were used with different formalin fixed, paraffin embedded tissues, allowing the identification of 15 different antigens. Four indirect polymer systems were used for amplification (Dako EnVision+ System - K4006; LabVision UltraVision LP Detection System - TL-004-HD; Leica NovoLink - RE7140-k; Vector ImmPRESS Reagent Kit - MP-7402). The microscopic observation and classification was based on an algorithm that fits intensity, specific staining, nonspecific staining and contrast, on an overall score which can take values between 0 and 25. For the statistical analysis it was used mainly the one-way ANOVA with post-hoc Tukey test ($\alpha = 0.05$). The best result in terms of mean/standard deviation of the scores was the NovoLink (22.4/2.37) and the worst was the EnVision+ (17.43/3.86). It was also found that there is statistical difference between the results obtained by the system NovoLink and the systems UltraVision ($p=.004$), ImmPRESS ($p=.000$) and EnVision+ ($p=.000$). It was concluded that the system allowing the best results in this study was the Leica NovoLink.

Keywords: Immunohistochemistry, amplification, polymer.

Índice	vii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xiv
1 Introdução	1
1.1 Sensibilidade do sistema de detecção.....	1
1.2 Métodos de polímero.....	2
1.2.1 Polímero de esqueleto interno.....	2
1.2.2 Micropolímeros de enzimas	3
1.3 Problema em estudo	3
1.4 Objetivos e Variáveis	4
1.5 Constituição do documento escrito	5
2 Quadro Teórico de Referência.....	6
2.1 Enquadramento histórico.....	6
2.2 Principais aplicações.....	7
2.3 Pré-requisitos para imunohistoquímica	8
2.4 Conceitos gerais de imunologia	9
2.4.1 Antígeno	9
2.4.2 Imunogénio	9
2.4.3 Anticorpo.....	10
2.4.4 Especificidade e afinidade de um anticorpo	10
2.4.5 Imunoglobulinas	11
2.4.6 Cadeias leves	13
2.4.7 Cadeias pesadas	13
2.4.8 Forças de ligação entre antígeno e anticorpo	14
2.5 Soros de anticorpos.....	16
2.5.1 Soros policlonais.....	16
2.5.2 Soros monoclonais	18
2.5.3 Soros monoclonais versus soros policlonais	20
2.5.4 Diluição de soros de anticorpos	20
2.6 Preparação de amostras para imunohistoquímica	21
2.6.1 Fixação.....	21
2.6.2 Processamento histológico	23
2.6.3 Preparação de lâminas	23
2.6.4 Microtomia.....	24
2.7 Recuperação antigénica	24
2.7.1 Digestão enzimática	25

2.7.2	Alta temperatura.....	25
2.8	Enzimas em imunohistoquímica.....	26
2.8.1	Horseradish Peroxidase (HRP).....	27
2.9	Inibição de partículas endógenas.....	28
2.9.1	Peroxidase Endógena	29
2.10	Contraste	29
2.11	Sistemas amplificativos de polímero.....	29
2.11.1	Características gerais.....	29
2.11.2	Metodologia prática	30
2.11.3	Sistemas de dois e três passos	30
2.11.4	Polímero de esqueleto interno.....	31
2.11.5	Micropolímeros de enzimas	33
3	Metodologia	36
3.1	Modelo conceptual adotado	36
3.2	Metodologia do estudo.....	36
3.2.1	Desenho investigacional.....	36
3.2.2	Classificação.....	37
3.3	Fase conceptual.....	38
3.3.1	Recolha documental.....	38
3.3.2	Definição das variáveis	38
3.3.3	Autorizações institucionais.....	39
3.4	Fase metodológica	40
3.4.1	EnVision+ System, HRP	40
3.4.2	ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit.....	41
3.4.3	UltraVision LP	41
3.4.4	NovoLink Polymer Detection System	41
3.4.5	Conceptualização do instrumento de recolha de dados.....	42
3.4.6	Construção do instrumento de recolha de dados.....	44
3.4.7	Pré-teste do instrumento de recolha de dados	46
3.5	Fase empírica.....	47
3.5.1	Pedidos às firmas comerciais	47
3.5.2	Tecidos histológicos.....	47
3.5.3	Soros primários.....	48
3.5.4	Técnica imunohistoquímica.....	48
3.5.5	Controlo de qualidade.....	50
3.5.6	Avaliação da qualidade da imunomarcacão.....	50
3.5.7	Tratamento dos dados	50
3.6	Formatação e Linguagem	53

3.7	Boas práticas investigacionais	53
3.7.1	Considerações éticas e deontológicas.....	53
3.7.2	Higiene e segurança no laboratório	53
3.7.3	Cuidados com material e reagentes.....	54
4	Resultados	56
4.1	Score Global.....	56
4.1.1	Valores gerais	56
4.1.2	Score Global EnVision+.....	57
4.1.3	Score Global ImmPRESS	58
4.1.4	Score Global UltraVision.....	58
4.1.5	Score Global Novolink	59
4.1.6	Análise geral dos sistemas de polímero	60
4.2	Antigénios de membrana celular	62
4.2.1	Score EnVision+	62
4.2.2	Score ImmPRESS.....	63
4.2.3	Score UltraVision	63
4.2.4	Score Novolink.....	64
4.2.5	Análise dos sistemas de polímero	64
4.3	Antigénios de citoplasma	66
4.3.1	Score EnVision+	66
4.3.2	Score ImmPRESS.....	67
4.3.3	Score UltraVision	67
4.3.4	Score Novolink.....	68
4.3.5	Análise dos sistemas de polímero	69
4.4	Antigénios de núcleo	70
4.4.1	Score EnVision+	70
4.4.2	Score ImmPRESS.....	71
4.4.3	Score UltraVision	71
4.4.4	Score Novolink.....	72
4.4.5	Análise dos sistemas de polímero	73
4.5	Parâmetros da grelha de avaliação da imunomarcção	74
4.5.1	Intensidade de imunomarcção.....	74
4.5.2	Imunomarcção específica.....	75
4.5.3	Imunomarcção inespecífica.....	76
4.5.4	Intensidade da coloração de contraste.....	77
4.6	Variabilidade inter-observador	79
5	Considerações Finais.....	80
5.1	Dos resultados dos antigénios de membrana celular	80

5.2	Dos resultados dos antigénios de citoplasma	80
5.3	Dos resultados dos antigénios de núcleo.....	80
5.4	Dos parâmetros da grelha de avaliação	80
5.5	Dos resultados globais.....	81
5.6	Da variabilidade inter-observador	83
5.7	Limitações e sugestões.....	83
6	Referências Bibliográficas.....	85
7	Apêndices	91
7.1	Apêndice 1 - Tampão EDTA 1 mM pH 8.0	91
7.2	Apêndice 2 - Tampão citrato, pH 6.0.....	91
7.3	Apêndice 3 - Tampão Tris/EDTA, pH9.0	91
7.4	Apêndice 4 – Instrumento de recolha de dados	92
7.5	Apêndice 5 - Protocolo da técnica imunohistoquímica	96
8	Anexos	97
8.1	Anexo 1- EnVision+ System, HRP (DakoCytomation. Ref:K4007).....	97
8.2	Anexo 2- ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit (Vector Laboratories, Inc. Ref: MP-7402)	103
8.3	Anexo 3- UltraVision LP (LABVision. Ref: TL-015-HD)	105
8.4	Anexo 4 - NovoLink Polymer Detection System (Novocastra TM. Ref: RE7140-CE).	107
8.5	Anexo 5 – Cadeias leves Kappa - KP-53 - Novocastra.....	111
8.6	Anexo 6 – Cadeias leves Lambda – HP-6054 - Novocastra.....	112
8.7	Anexo 7 – Caldesmon - h-CD - DakoCytomation.....	113
8.8	Anexo 8 - CD 105 - SN6h - DakoCytomation	115
8.9	Anexo 9 - CD 45 RA - X148 - Novocastra TM	117
8.10	Anexo 10 - CD 79a - 11D10 - Novocastra TM	118
8.11	Anexo 11 - CD 8 - 4B11 - Novocastra TM	119
8.12	Anexo 12 – CEA - 12-140-10 - Novocastra TM	122
8.13	Anexo 13 - CK 7 - OV-TL 12/30 - Novocastra TM.....	123
8.14	Anexo 14 - CK 8/18 - 5D3 - Novocastra TM.....	125
8.15	Anexo 15 – Desmina - DER11 - Novocastra TM.....	127
8.16	Anexo 16 - Ki67 - MM1 - Novocastra TM	129
8.17	Anexo 17 - Receptores de Progesterona - 1A6 - Novocastra TM.....	131
8.18	Anexo 18 – Vimentina - V9 - Novocastra TM	133
8.19	Anexo 19 – α FP - C3 - Novocastra TM	135
8.20	Anexo 20 – DAB Substrate Kit for Peroxidase	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – FITC conjugado com marcador anti-nuclear factor HEP 2.....	6
Figura 2 – Imunomarcação por HRP associada a anticorpos anti-actina do músculo liso (A) e fosfatase alcalina associada a anticorpos anti-insulina (B).....	6
Figura 3 – Autoradiogramas com vitamina D marcada com trítio na amígdala cerebral.	7
Figura 4 – Epítopo e paratopo.....	10
Figura 5 - Especificidade do anticorpo	10
Figura 6 – Aspeto esquemático de uma imunoglobulina.....	11
Figura 7 – Quebra da molécula de anticorpo.....	11
Figura 8 – Zona de hinge do anticorpo.....	12
Figura 9 – Localização das diferentes zonas estruturais do anticorpo.....	12
Figura 10 – Interação entre zonas hipervariáveis e ligações dissulfídicas do anticorpo.....	13
Figura 11 – Estrutura esquemática das diferentes imunoglobulinas.....	14
Figura 12 – ligação eletroestática (iónica).....	15
Figura 13 – ligação por ponte de hidrogénio	15
Figura 14 – Ligações hidrofóbicas	16
Figura 15 – Ligações por forças de van der Waals	16
Figura 16 – Soro policlonal	17
Figura 17 – Produção de soro policlonal	17
Figura 18 – Soro monoclonal.....	18
Figura 19 - Milstein e Kohler	18
Figura 20 – Produção de soros monoclonais.	19
Figura 21 – Soros pré-diluídos.....	20
Figura 22 – Ponte de metileno entre aminoácidos.	22
Figura 23 – Alteração estrutural em proteínas fixadas por formaldeído.....	22
Figura 24 – Processador automático de tecidos	23
Figura 25 – Cortes de parafina	24
Figura 26 – Reação entre Ca ²⁺ e EDTA	26
Figura 27 – Horseradish.....	27
Figura 28 – Estrutura tridimensional da HRP. O grupo heme está localizado no centro com o átomo de ferro a vermelho e os iões de cálcio são as esferas pretas	27
Figura 29 – sequência de revelação da presença da enzima peroxidase por 3,3'DAB	28
Figura 30 - A colocação do segundo anticorpo permite aumentar a quantidade de polímeros ligados	31

Figura 31 - A colocação do segundo anticorpo permite associar o polímero ao antígeno	31
Figura 32 – Polímero de esqueleto interno.....	31
Figura 33 - Dextrano (esquerda - estrutura química; centro - aspeto físico; direita - <i>Leuconostoc mesenteroides</i>).....	32
Figura 34 – Polímero de esqueleto interno indireto	33
Figura 35 – Polímero de esqueleto interno com três passos.....	33
Figura 36 – Micropolímero de enzimas indireto	34
Figura 37 – Polímero de três passos.....	34
Figura 38 – Modelo conceptual do estudo	36
Figura 39 – Desenho de investigação.....	37
Figura 40 – Embalagem do sistema EnVision+.....	40
Figura 41 – Embalagem do sistema ImmPRESS.....	41
Figura 42 – Embalagem do sistema UltraVision LP	41
Figura 43 – Embalagem do sistema NovoLink.....	42
Figura 44 – Conceptualização da metodologia de recolha de dados.....	43
Figura 45 – Operacionalização da metodologia de recolha de dados	44
Figura 46 – Algoritmo para obtenção do Score Global	46
Figura 47 – Esquerda - micrótomo rotativo; Centro – lâminas adesivadas; Direita - estufa de secagem	47
Figura 48 – Preparação da incubação do soro primário	49
Figura 49 – Símbolo GHS para substância nociva.....	55
Figura 50 – Distribuição de Score Global	57
Figura 51 – Diagrama de caixas para os sistemas de polímero em estudo.....	60
Figura 52 – Histograma de Score Global para os sistemas de polímero em estudo.....	60
Figura 53 – Média e desvio-padrão do Score Global para os sistemas estudados	61
Figura 54 – Imunomarcção para CD45RA – ampliação 400x.....	62
Figura 55 – Distribuição de Score Global relativo a antígenos de membrana celular	64
Figura 56 – Média e desvio-padrão do Score Global dos antígenos de membrana celular para os sistemas estudados	65
Figura 57 – Imunomarcção para CD8 – ampliação 400x.....	66
Figura 58 – Distribuição de Score Global relativo a antígenos de citoplasma	68
Figura 59 – Média e desvio-padrão do Score Global dos antígenos de citoplasma para os sistemas estudados.....	69
Figura 60 – Imunomarcção para Desmina – ampliação 400x.....	70
Figura 61 – Distribuição de Score Global relativo a antígenos nucleares	72

Figura 62 – Média e desvio-padrão do Score Global dos antigénios de núcleo para os sistemas estudados	73
Figura 63 – Imunomarcção para PgR – ampliação 400x.....	73
Figura 64 – Dispersão dos resultados dos avaliadores.....	79
Figura 65 – Contrastes pela hematoxilina de Harris (esquerda) e hematoxilina de Mayer (direita)....	82
Figura 66 – Imunomarcção para cadeias leves Kappa – ampliação 400x	83
Figura 67 - representação esquemática das aplicações práticas da imuno-PCR	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores em imunohistoquímica.....	7
Tabela 2 – Métodos imunohistoquímicos disponíveis.....	7
Tabela 3 – Aplicações da imunohistoquímica.....	8
Tabela 4 – Pré-requisitos para imunohistoquímica.....	8
Tabela 5 – Vantagens e desvantagens de soros policlonais e monoclonais.....	20
Tabela 6 - Reagentes disponibilizados por cada sistema.....	40
Tabela 7 - Classificação da intensidade de imunomarcção.....	45
Tabela 8 - Classificação da imunomarcção específica.....	45
Tabela 9 - Classificação da imunomarcção inespecífica.....	45
Tabela 10 - Classificação da intensidade de coloração de contraste.....	46
Tabela 11 – Características histológicas de alguns dos órgãos utilizados ⁽⁹⁶⁾	47
Tabela 12 – Características dos soros utilizados.....	48
Tabela 13 - Protocolo utilizado.....	49
Tabela 14 - obtenção das unidades de análise.....	51
Tabela 15 – Interpretação do Alfa de Cronbach.....	53
Tabela 16 - Frequências de Score Global.....	56
Tabela 17 - Estatística descritiva de Score Global.....	57
Tabela 18 - Estatística descritiva de Score Global EnVision+.....	58
Tabela 19 - Estatística descritiva de Score Global ImmPRESS.....	58
Tabela 20 - Estatística descritiva de Score Global UltraVision.....	59
Tabela 21 - Estatística descritiva de Score Global Novolink.....	59
Tabela 22 – <i>One-Way</i> ANOVA - Tukey HSD para os sistemas em função do Score Global.....	61
Tabela 23 - Estatística descritiva de Score Global EnVision+ em membrana celular.....	62
Tabela 24 - Estatística descritiva de Score Global ImmPRESS em membrana celular.....	63
Tabela 25 - Estatística descritiva de Score Global UltraVision em membrana celular.....	63
Tabela 26 - Estatística descritiva de Score Global Novolink em membrana celular.....	64
Tabela 27 – <i>One-Way</i> ANOVA - Tukey HSD em função do Score Global dos marcadores de membrana celular.....	65
Tabela 28 - Estatística descritiva de Score Global EnVision+ em citoplasma.....	66
Tabela 29 - Estatística descritiva de Score Global ImmPRESS em citoplasma.....	67
Tabela 30 - Estatística descritiva de Score Global UltraVision em citoplasma.....	68
Tabela 31 - Estatística descritiva de Score Global Novolink em citoplasma.....	68

Tabela 32 – <i>One-Way</i> ANOVA - Tukey HSD em função do Score Global dos marcadores de citoplasma	69
Tabela 33 - Estatística descritiva de Score Global EnVision+ em núcleo	70
Tabela 34 - Estatística descritiva de Score Global ImmPRESS em núcleo	71
Tabela 35 - Estatística descritiva de Score Global UltraVision em núcleo	72
Tabela 36 - Estatística descritiva de Score Global Novolink em núcleo	72
Tabela 37 - Frequências de intensidade de imunomarcacão geral.....	74
Tabela 38 - Frequências de intensidade de imunomarcacão EnVision+	74
Tabela 39 - Frequências de intensidade de imunomarcacão ImmPRESS.....	74
Tabela 40 - Frequências de intensidade de imunomarcacão UltraVision.....	75
Tabela 41 - Frequências de intensidade de imunomarcacão Novolink	75
Tabela 42 - Frequências de imunomarcacão específica geral.....	75
Tabela 43 - Frequências de imunomarcacão específica EnVision+	75
Tabela 44 - Frequências de imunomarcacão específica ImmPRESS.....	76
Tabela 45 - Frequências de imunomarcacão específica UltraVision.....	76
Tabela 46 - Frequências de imunomarcacão específica Novolink	76
Tabela 47 - Frequências de imunomarcacão inespecífica geral.....	76
Tabela 48 - Frequências de imunomarcacão inespecífica EnVision+	77
Tabela 49 - Frequências de imunomarcacão inespecífica ImmPRESS.....	77
Tabela 50 - Frequências de imunomarcacão inespecífica UltraVision.....	77
Tabela 51 - Frequências de imunomarcacão inespecífica Novolink	77
Tabela 52 - Frequências de intensidade de coloraçã de contraste geral.....	78
Tabela 53 - Frequências de intensidade de coloraçã de contraste EnVision+	78
Tabela 54 - Frequências de intensidade de coloraçã de contraste ImmPRESS.....	78
Tabela 55 - Frequências de intensidade de coloraçã de contraste UltraVision.....	78
Tabela 56 - Frequências de intensidade de coloraçã de contraste Novolink.....	79

A imunohistoquímica é o conjunto de metodologias em que se utilizam anticorpos como reagentes específicos capazes de identificar e estabelecer ligação com constituintes tecidulares que funcionam como antígenos. Esta ligação permite situar e identificar a presença de variadas substâncias nas células e tecidos por intermédio da cor que é associada aos complexos antígeno-anticorpo entretanto formados ⁽¹⁾.

O valor prático desta área tecnológica, muito utilizada em Anatomia Patológica, resulta da possibilidade de combinar um marcador com um anticorpo, sem provocar qualquer tipo de dano à ligação específica estabelecida entre anticorpo e antígeno. Este facto propicia a observação microscópica dos locais onde se encontra o anticorpo e, conseqüentemente, o antígeno.

Podemos dizer que a imunohistoquímica se apresenta como um poderoso meio de identificação de várias estruturas celulares e tecidulares que podem estar diretamente associadas a patologias, bem como das conseqüências, a nível funcional e morfológico, da ação desses mesmos elementos ⁽²⁾.

Na última vintena de anos a crescente valorização de diagnósticos diferenciais em Anatomia Patológica tem implicado um desenvolvimento progressivo da imunohistoquímica, levando a um progresso das metodologias para demonstração de antígenos em tecido fixado em formaldeído e incluído em parafina, o que tem contribuído significativamente para o diagnóstico de muitas patologias ⁽³⁾.

De acordo com Werner ⁽⁴⁾:

During the last two decades, immunohistochemistry has become the most useful adjunctive method in diagnostic histopathology.

Não obstante, persistem algumas dificuldades, eco das particularidades de determinadas patologias e limitações técnicas, pelo que a padronização da imunohistoquímica tem sido uma tarefa dura de completar. A qualidade da marcação depende de três principais fatores além da qualidade dos anticorpos ^{(5) (6)}:

- i) Fase pré-analítica (destacando-se fixação do tecido e processamento);
- ii) Recuperação antigénica de epítomos;
- iii) Sensibilidade do sistema de deteção.

Esta última será alvo da presente investigação.

1.1 Sensibilidade do sistema de deteção.

Uma vez que os anticorpos, como proteínas que são, não possuem cor própria nem outra forma de serem visualizados nas preparações histológicas e citológicas, foi necessário encontrar forma de lhes conferir a capacidade de serem observáveis quando se encontram ligados aos antígenos que se procura detetar. Para concretizar este intento, em 1941, Albert Coons e seus colaboradores ⁽⁷⁾ associaram ao anticorpo uma molécula marcadora fluorescente que permitia assim identificar a presença do

antigénio. No entanto, tendo em conta que a quantidade de moléculas marcadoras por cada molécula de antigénio tecidual era muito reduzida ou seja a amplificação do sinal visualizável era medíocre, na maior parte das vezes não era possível visualizar a presença deste, surgindo uma elevada taxa de falsos negativos, o que limitava a exequibilidade da imunohistoquímica a situações excecionais e esporádicas.

O grande objetivo tem sido assim, desde sempre, criar uma marcação estável com uma intensidade suficiente, que não suscite qualquer tipo de dúvidas relativamente à presença ou ausência do antigénio no tecido. Todos os investigadores ambicionaram continuamente associar o máximo de moléculas visualizáveis a cada complexo anticorpo-antigénio^{(1) (2) (8)}.

Ao longo dos anos têm sido desenvolvidas abundantes formas de aumentar o sinal que está associado ao antigénio tecidual - método indireto simples, método PAP, métodos da avidina-biotina, entre outros^{(9) (10) (11) (12) (13) (14)}. Algumas dessas metodologias não singraram e nunca obtiveram uma expansão relevante, outras tiveram muita aplicabilidade no seu tempo mas foram ultrapassadas e não são praticamente utilizadas nos dias de hoje⁽¹⁵⁾.

Surgiu, posteriormente, uma metodologia de aplicação simples e que propõe uma amplificação superior: é o denominado método indireto de polímero^{(16) (17)}.

1.2 Métodos de polímero

A utilização dos polímeros na área da imunohistoquímica trouxe como mais-valias, o grande poder de amplificação, a diminuição de fatores de erro, a rapidez e a simplicidade, quando comparado com os outros métodos imunohistoquímicos^{(18) (19)}. O facto de estes sistemas não possuírem nem (strept)avidina, nem biotina torna desnecessária a utilização de reagentes bloqueadores⁽²⁾. A grande desvantagem é o facto de ser um método um pouco mais dispendioso, o que, apesar de tudo, é um fator “menor” tendo em conta as qualidades que apresenta⁽²⁰⁾.

Existem atualmente diversos métodos que recorrem a polímeros para aplicação em imunohistoquímica. O seu desenvolvimento teve praticamente sempre o mesmo denominador comum: a procura de uma amplificação de sinal mais potente. Os métodos que maior sucesso obtiveram foram os de esqueleto interno e os de micropolímeros de enzimas.

1.2.1 Polímero de esqueleto interno

Como o próprio nome indica estas metodologias recorrem a uma macromolécula constituída por um esqueleto central de grandes dimensões, ao qual estão acopladas grandes quantidades de anticorpos e moléculas propiciadoras da visualização que são normalmente enzimas (*Horseradish Peroxidase*-HRP)⁽¹⁷⁾.

A principal molécula utilizada como esqueleto interno é o dextrano, um polissacarídeo de elevado peso molecular que pode chegar a 500 kDa. Os dextranos consistem em sequências de unidades de α -D-glicose ligadas predominantemente por ligações glicosídicas α -1, 6. São produzidos a partir da

sacarose durante o crescimento de bactérias pertencentes aos géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, todas pertencentes à família *Lactobacillaceae*. No entanto, a maioria dos dextranos é sintetizada pela bactéria da espécie *Leuconostoc mesenteroides*. O Dextrano possui pH neutro, é solúvel em água e possui uma estabilidade elevada e duradoura⁽²¹⁾.

Neste método aplica-se um anticorpo primário dirigido contra o antígeno pretendido e posteriormente aplica-se o polímero que possui anticorpos secundários e HRP^{(22) (23)}.

Por possuir só dois passos, trata-se de um método extremamente rápido e fácil, evidenciando uma diminuição de fatores de erro. Para além disso é um método muito amplificativo, deslocando bastantes moléculas propiciadoras de visualização por molécula de antígeno.

1.2.2 Micropolímeros de enzimas

Estes métodos baseiam-se na polimerização de enzimas e sua associação a anticorpos, formando os micropolímeros de enzima, sendo considerados a segunda geração dos sistemas de polímeros. Segundo os seus fabricantes esta abordagem evita os problemas decorrentes do uso, como esqueleto, de dextrano ou de outras macromoléculas^{(23) (24) (25)}. O micropolímero com uma alta densidade de enzima muito ativa acoplada a um anticorpo secundário gera um reagente, que supera a interferência estérica, que advém do enorme volume ocupado pelo polímero de esqueleto interno. Este método proporciona maior acessibilidade ao antígeno pois a pequena dimensão dos seus reagentes permite uma melhor difusão para os pontos-alvo e uma redução da ligação não específica⁽²³⁾.

1.3 Problema em estudo

Considerando a vasta gama de sistemas de amplificação baseados em polímeros que hoje em dia vão surgindo, há um interesse em selecionar o mais amplificativo e versátil, no sentido de otimizar as técnicas realizadas^(26; 27).

Tendo em conta os diferentes produtos existentes no mercado, selecionaram-se quatro, pela sua vasta utilização e a disponibilidade de cedência por parte dos fabricantes: EnVision+ System HRP Mouse (DAB+), ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit, UltraVision LP e Novolink Polymer Detection System.

O sistema de amplificação EnVision+ da Dako apresenta um polímero constituído por uma grande molécula de dextrano, não contendo avidina ou biotina, pelo que a marcação inespecífica resultante de atividade endógena da biotina em tecidos como o fígado ou o rim, não ocorre⁽²²⁾. Numa experiência desenvolvida em Itália, Sabbatini e colegas compararam o sistema EnVision+ com outras metodologias não baseadas em polímeros (*alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase - APAAP*, avidina-biotina, *catalyzed signal amplification-CSA*, entre outros), chegando à conclusão que o EnVision+ é um sistema fácil de usar, reduzindo o custo por teste e permitindo o aumento das diluições dos anticorpos primários⁽¹⁷⁾. Sendo um procedimento de dois passos, reduz o tempo do ensaio e simplifica a técnica. Apenas o método CSA permitiu resultados semelhantes ao EnVision+⁽¹⁷⁾.

Wiedorn e colegas vieram provar que o sistema EnVision+ quando aplicado após a hibridização *in situ* resulta num aumento considerável de intensidade e sensibilidade, sem perda de especificidade quando comparado com os resultados convencionais⁽²⁰⁾. Os mesmos autores afirmam que o EnVision+ é fácil de aplicar, requer menor tempo para a realização da técnica e não apresenta os problemas de marcação de fundo que podem ser encontrados com outros sistemas não poliméricos⁽²⁰⁾.

O ImmPRESS da Vector Laboratories é baseado no método de micropolímeros de enzimas, evitando o uso de grandes moléculas de dextrano que atuam como esqueleto interno. A ligação do micropolímero ao anticorpo permite que uma elevada quantidade de enzimas se liguem ao alvo com um mínimo de interferência, daqui resultando uma redução dos passos do protocolo, uma maior intensidade de marcação específica e menor fundo⁽²³⁾.

O UltraVision LP da LabVision também pertence à segunda geração de polímeros, sendo composto por subunidades mais pequenas de polímeros, o que minimiza conflitos de marcação inespecífica, tendo como resultado uma marcação mais consistente e uma melhor amplificação do sinal. De acordo com as indicações do fabricante, com o UltraVision LP é possível diminuir gastos em anticorpo primário e obtém-se melhor relação entre marcação específica e fundo. Também não utiliza biotina, o que impede o fundo característico dos métodos de LSAB⁽²⁵⁾.

O NovoLink da Novocastra à semelhança de outros sistemas de amplificação referidos, também utiliza uma nova tecnologia de controlo da polimerização para a preparação de conjugados de anticorpo-HRP⁽²⁸⁾. Skaland e seus colaboradores determinaram que este sistema é altamente ampliativo, nomeadamente quando é utilizado em sequência da aplicação de soros monoclonais⁽²⁷⁾.

Apesar da existência de todos estes estudos, permanece um vazio relativamente à comparação direta entre os sistemas que serão avaliados no presente trabalho, justificando-se assim a sua realização.

1.4 Objetivos e Variáveis

Com a finalidade de aumentar a aplicabilidade das técnicas imunohistoquímicas e melhorar os seus resultados laboratoriais, neste trabalho pretendeu-se analisar as capacidades de amplificação de quatro sistemas de polímero atualmente disponíveis no mercado.

Sucintamente delinearão-se os seguintes objetivos específicos:

1. Comparar os resultados imunohistoquímicos obtidos pela aplicação dos sistemas de amplificação:
 - a. EnVision+ System HRP Mouse (DAB+).
 - b. ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit;
 - c. UltraVision LP;
 - d. Novolink Polymer Detection System.
2. Identificar o sistema de amplificação que permite obter a melhor qualidade de marcação imunohistoquímica em marcadores de antigénios membranares, citoplasmáticos e nucleares.

3. Identificar o sistema de amplificação que permite obter a melhor qualidade de marcação imunohistoquímica em marcadores de utilização geral de rotina no laboratório de anatomia patológica.

Considerou-se como variável independente, o sistema de amplificação utilizado, e, como variável dependente, a qualidade final da marcação imunohistoquímica obtida.

1.5 Constituição do documento escrito

Este trabalho inicia-se com a introdução e abordagem do problema em estudo e objetivos, elementos que constituem o capítulo I. Integram o capítulo II, o quadro teórico de referência, com uma abordagem geral sobre imunohistoquímica, destacando a contextualização relativa aos sistemas de amplificação, mas não descurando a referência aos conceitos de antigénio, anticorpo, produção de soros mono e policlonais, características da fixação e fixadores, métodos utilizados na recuperação antigénica e aspetos gerais sobre a técnica de imunomarcação utilizada. No capítulo III serão descritas as metodologias, variáveis e procedimentos utilizados durante o estudo. A apresentação dos resultados e o tratamento de dados fazem parte do capítulo IV. Por último, no capítulo V, surgem as considerações finais, que incluem a discussão de resultados bem como as limitações do estudo e sugestões para trabalhos futuros.

O quadro teórico de referência surge diretamente do levantamento bibliográfico realizado para a elaboração do *estado da arte* de um problema de pesquisa, ou seja aquilo que já foi feito, dito e discutido sobre esse tema. Elevando-se do *estado da arte*, a fundamentação teórica implica um avanço em relação a este, na medida em que resulta de uma escolha consciente, crítica e avaliativa da teoria que está melhor equipada para fundamentar o desenvolvimento da pesquisa, em consonância com a metodologia que designa ⁽²⁹⁾.

2.1 Enquadramento histórico

A primeira técnica imunohistoquímica foi introduzida por Coons, Creech e Jones ⁽⁷⁾ em 1941, e consistiu na conjugação de um anticorpo com um corante fluorescente e sua utilização para identificação de antigénios em cortes histológicos, o que significou a entrada numa nova dimensão do diagnóstico anatomopatológico.

O primeiro composto a ser conjugado com um anticorpo foi o isocianato de fluoresceína ⁽⁷⁾ e, mais tarde, surgiu o isotiocianato de fluoresceína (FITC), mais fácil de conjugar. O FITC tem excitação e emissão ao nível dos comprimentos de onda de aproximadamente 495nm a 521nm. Como a maioria dos fluorocromos, é propenso a fotodegradação ⁽²⁾ - Figura 1.

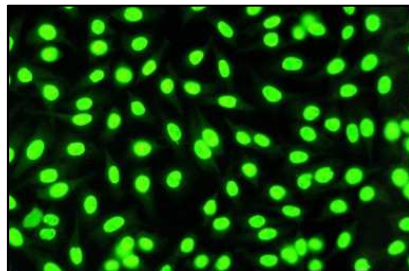


Figura 1 – FITC conjugado com marcador anti-nuclear factor HEP 2

Fonte: <http://www.zeiss.de/c1256b5e0047ff3f/Contents-Frame/d8b6c4c29990d932c125706800507aaf>

Gradualmente passaram a utilizar-se novos compostos marcadores como as enzimas HRP em 1966 ⁽³⁰⁾ e fosfatase alcalina em 1978 ⁽³¹⁾ - Figura 2.

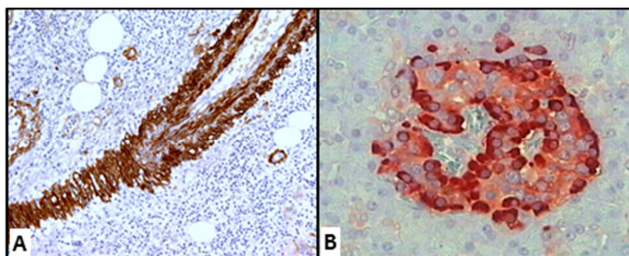


Figura 2 – Imunomarcação por HRP associada a anticorpos anti-actina do músculo liso (A) e fosfatase alcalina associada a anticorpos anti-insulina (B).

Também se tornou possível a marcação de anticorpos com substâncias radioativas ⁽³²⁾, visualizando-se o resultado por autoradiografia - Figura 3.

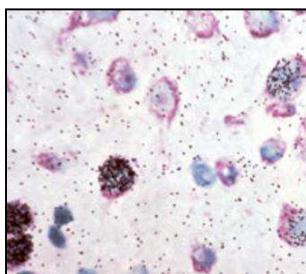


Figura 3 – Autoradiogramas com vitamina D marcada com trítio na amígdala cerebral.

Fonte: <http://www.leica-microsystems.com/products/total-histology/cryosectioning/details/product/leica-cm3600-xp/application/>

O produto final das reações enzimáticas pode adquirir eletrodensidade, mas existem outros produtos que intrinsecamente já possuem esta capacidade, podendo ser utilizados em imunohistoquímica para microscopia eletrônica: ferritina desde 1961 ⁽³³⁾ e ouro coloidal desde 1971 ⁽³⁴⁾ - Tabela 1.

Grupo	Nome
Compostos fluorescentes	Isotiocianato de Fluoresceína
	Isotiocianato de Rodamina
Enzimas	Peroxidase (HRP)
	Fosfatase alcalina
Metais pesados	Ferritina
	Ouro coloidal
Compostos Radioativos	¹⁴ C
	³⁵ S

Tabela 1 – Marcadores em imunohistoquímica

O primeiro método a ser utilizado foi o direto simples mas, ao longo do tempo, foram surgindo inovações que permitiram um aumento paulatino da capacidade de amplificação das metodologias imunohistoquímicas - Tabela 2.

Método direto simples		
Métodos indiretos	Simple	
	Enzima anti-enzima	PAP (peroxidase anti peroxidase)
		APAAP (fosfatase alcalina anti fosfatase alcalina)
	Avidina – biotina	Streptavidin-Biotin Complex (ABC)
		Labelled streptavidin-Biotin (LSAB)
	Polímero	Polímero direto (EPOS)
Polímero indireto		

Tabela 2 – Métodos imunohistoquímicos por ordem cronológica

2.2 Principais aplicações

A imunohistoquímica tem as suas principais aplicações ao nível do estudo de neoplasias, doenças infecciosas e doenças degenerativas, podendo, no entanto, ser aplicada no estudo de muitas outras patologias - Tabela 3.

É uma disciplina em permanente evolução, devendo todos os investigadores que se dedicam a esta atividade permanecer em constante procura, no sentido de estabelecer novos protocolos, adaptando às suas necessidades toda a gama de reagentes disponível no mercado ⁽²⁾.

Estudo de neoplasias	Diagnóstico	Diagnóstico de neoplasias de baixa diferenciação morfológica	
		Caracterização da histogênese e patogênese	
		Distinção do carácter maligno ou benigno de proliferações celulares (ex. plasmócitos)	
		Caracterização da origem de metástases indiferenciadas	
	Prognóstico	Identificação da presença de recetores hormonais (ex. ER e PgR)	
		Caracterização da expressão de proto-oncogenes (ex. Her2/neu)	
		Estudo de proteínas supressoras de tumor (ex. p53)	
Indicação terapêutica	Caracterização da presença de indicadores de proliferação celular (ex. Ki67)		
	Quantificação da expressão de Her2/neu em neoplasia mamária (trastuzumab)		
Estudo de doenças infecciosas	Identificação da presença de CD117 em tumores do estroma gástrico (Glivec)		
	Caracterização dos agentes etiológicos (bactérias, vírus e protozoários)		
Estudo de outras patologias	Fenotipagem da reação inflamatória envolvente		
	Caracterização de subtipos de amiloidose		
	Caracterização de produtos de secreção de células	Hormonas Enzimas	

Tabela 3 – Aplicações da imunohistoquímica

2.3 Pré-requisitos para imunohistoquímica

Tal como qualquer outro tipo de tecnologia, a imunohistoquímica, necessita de respeitar determinados requisitos de modo a que possa ser realizada de uma forma correta e eficaz ⁽²⁾.

A primeira condição a respeitar é que o antigénio deve permanecer insolúvel, mas disponível no tecido, no decorrer da técnica. Note-se que essa insolubilidade implica a sua permanência no local original. A par disso, deve também apresentar as características que vão ser reconhecidas pelo anticorpo, daí que, nalguns casos, seja necessário aplicar métodos de recuperação antigénica.

A segunda condição é a marcação específica pelo anticorpo primário, isto é, o anticorpo deverá apenas ligar-se ao antigénio pretendido (marcação específica) e não a outros elementos estranhos (marcação inespecífica). O que se pretende obter é uma marcação específica do antigénio com ausência de marcação inespecífica de fundo ⁽²⁾.

Depois temos a terceira condição: é fundamental conhecer os atributos dos tipos de soros a aplicar: clonalidade, classe/subclasse da imunoglobulina, especificidade, reatividade e condições de manuseamento, revelam-se essenciais para a interpretação de resultados, bem como para a avaliação da qualidade da técnica ⁽²⁾.

Finalmente surge a quarta e última condição: para uma escrupulosa realização destas técnicas é imprescindível o uso de uma marcação estável com uma intensidade suficiente, que não suscite qualquer tipo de dúvidas relativamente à presença ou ausência do antigénio no tecido ⁽²⁾ (Tabela 4).

PRÉ-REQUISITO	CARACTERÍSTICAS
Antigénio disponível	O antigénio deverá permanecer insolúvel mas disponível
	A sua insolubilidade implica a sua permanência no local original
	O antigénio deverá manter-se reconhecível pelo anticorpo (com ou sem métodos de recuperação)
Marcação específica	O anticorpo deverá ligar-se ao antigénio pretendido
Anticorpo bem caracterizado	Deverão ser conhecidos todos os elementos teciduais que despoletam resposta por parte do anticorpo
	Deverá ser perfeitamente conhecida toda a sequência de ligação anticorpo-antigénio
	Deverá conhecer-se a espécie animal onde foi produzido o anticorpo
	As características do anticorpo deverão ser estabelecidas: Classe, Subclasse, Modo de produção.
Produto final ou marcador facilmente visualizável	Fluoresceína ou rodamina
	Peroxidase (HRP)
	Fosfatase alcalina
	Glucose oxidase

Tabela 4 – Pré-requisitos para imunohistoquímica.

2.4 Conceitos gerais de imunologia

2.4.1 Antigénio

Um antigénio é geralmente uma molécula com razoável dimensão, como uma proteína, um lípido, um hidrato de carbono ou um ácido nucleico, que uma vez introduzido num organismo induz uma resposta por parte do sistema imunitário, com produção de anticorpos específicos. Tal deve-se ao facto de cada antigénio ser constituído por diversos radicais químicos, com capacidade de promover a produção de anticorpos ou imunoglobulinas⁽³⁵⁾.

Os antigénios são reconhecidos principalmente devido à sua estrutura tridimensional, resultante da sua nuvem de eletrões, sendo este facto consistente com a natureza das afinidades antigénio-anticorpo⁽²⁾. Cada uma destas moléculas apresenta na sua superfície, um ou mais locais específicos de ligação ao anticorpo – determinante antigénico ou epítopo. Estas regiões de ligação altamente específicas são constituídas por sequências (completas ou fragmentos) de proteínas ou de polissacarádeos⁽³⁵⁾.

Tendo em conta que, segundo a sua estrutura, os antigénios apresentam a capacidade de estabelecer ligações com um dado anticorpo, todas as moléculas podem constituir potenciais antigénios⁽³⁵⁾. Releve-se que, quando essas moléculas evidenciam um peso molecular superior a 8 kDa, possuem a capacidade de atuar por si só como antigénios. Por sua vez, substâncias de baixo peso molecular podem ligar-se a moléculas com um peso molecular superior (os chamados haptenos), e desempenhar as funções de antigénio^{(35) (36)}.

2.4.2 Imunogénio

Um imunogénio é um antigénio, sintético ou natural, utilizado para produzir anticorpos em massa. A fonte e preparação de um imunogénio são muito importantes para se obter a melhor qualidade de reagentes para técnicas imunohistoquímicas. Existem dois grandes grupos de imunogénios: péptidos sintéticos e proteínas purificadas. Os péptidos sintéticos têm a vantagem de possuir uma sequência de aminoácidos conhecida, contudo, pode não ser possível alcançar laboratorialmente a conformação tridimensional da proteína nativa, o que pode originar falsos negativos se a aplicação do anticorpo criado a partir deste imunogénio não for devidamente caracterizada. Pode ainda ser impossível recriar determinado antigénio *in vitro* visto que as modificações pós-traducionais representam muitas vezes um importante processo para a conformação final de um antigénio *in vivo*. O uso de antigénios purificados evita muitos destes problemas, mas origina outros. O processo de purificação é muitas vezes difícil de otimizar, podendo o produto final conter demasiadas proteínas contaminantes. Um outro problema ao utilizar antigénios purificados, prende-se com a presença de outros epítomos que não são específicos para a obtenção do anticorpo pretendido⁽⁶⁾.

2.4.3 Anticorpo

Nome dado às moléculas de natureza proteica que são produzidas maioritariamente pelos plasmócitos em resposta à presença de material reconhecido como estranho. A sua principal característica é combinar-se com o material indutor (antigénio) em condições fisiológicas favoráveis à sua ligação. O local de ligação ao epítopo é denominado paratopo - Figura 4. Esta ligação constitui a base da Imunohistoquímica⁽¹⁾.

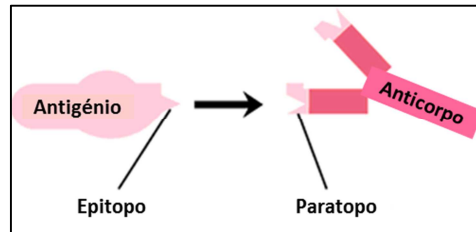


Figura 4 – Epítopo e paratopo

Fonte: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/determinant>

2.4.4 Especificidade e afinidade de um anticorpo

A especificidade é a característica de um anticorpo que lhe permite reconhecer e estabelecer ligações com antigénios individualizados e específicos⁽³⁵⁾ - Figura 5.

Depende da proximidade e da complementaridade entre antigénio e anticorpo. A alta complementaridade vai estar relacionada com a proximidade entre grupos específicos no antigénio e no anticorpo que estabelecem ligações muito fortes entre si, por perfeita correspondência⁽²⁾.

A afinidade é a característica que define a força de ligação entre um antigénio e um anticorpo. Se existirem muitas complementaridades entre estes elementos ao nível estrutural e químico surgirá uma elevada força de ligação e consequentemente uma alta afinidade. Por outro lado se existirem poucas complementaridades iremos ter baixa força de ligação e baixa afinidade⁽³⁷⁾.

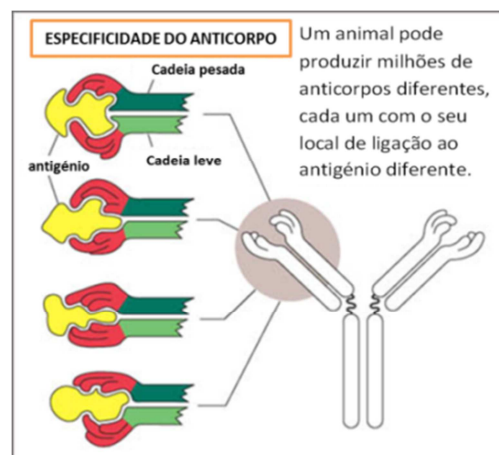


Figura 5 - Especificidade do anticorpo

Fonte: http://www.cisncancer.org/research/new_treatments/immunotherapy/promise.html

2.4.5 Imunoglobulinas

Classe de proteínas que possuem atividade de anticorpo. As imunoglobulinas podem ser visualizadas no microscópio eletrónico e demonstram uma conformação em Y, que é tomada como exemplo quando se quer representar um anticorpo^(2; 38) - Figura 6.

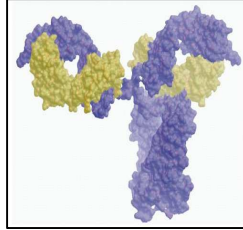


Figura 6 – Aspeto esquemático de uma imunoglobulina.

Fonte: http://imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/QuestionsAnswers/_UK/PosterIGH/imagesIgH.html

Cada imunoglobulina possui uma estrutura básica constituída por quatro cadeias proteicas: duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas, unidas por ligações dissulfídicas que mantêm a estabilidade do anticorpo⁽³⁵⁾.

A enzima papaína divide a molécula em dois fragmentos com capacidade de ligação ao antigénio - Fab (*fragment antigen binding*) - e um fragmento sem capacidade de ligação ao antigénio - Fc (*fragment crystallisable*) - Figura 7. A molécula também pode ser quebrada pela enzima pepsina dando origem a um fragmento específico: F(ab')₂, com capacidade de ligação ao antigénio e cristalização - Figura 7. A maioria dos anticorpos utilizados em imunohistoquímica são tratados desta forma para evitar reatividade cruzada com a porção pFc' que é reconhecida por alguns recetores de células humanas, podendo originar falsos positivos⁽⁸⁾.

Por redução e acidificação pode-se dividir uma imunoglobulina nos seus constituintes básicos: cadeias pesadas e leves - Figura 7.

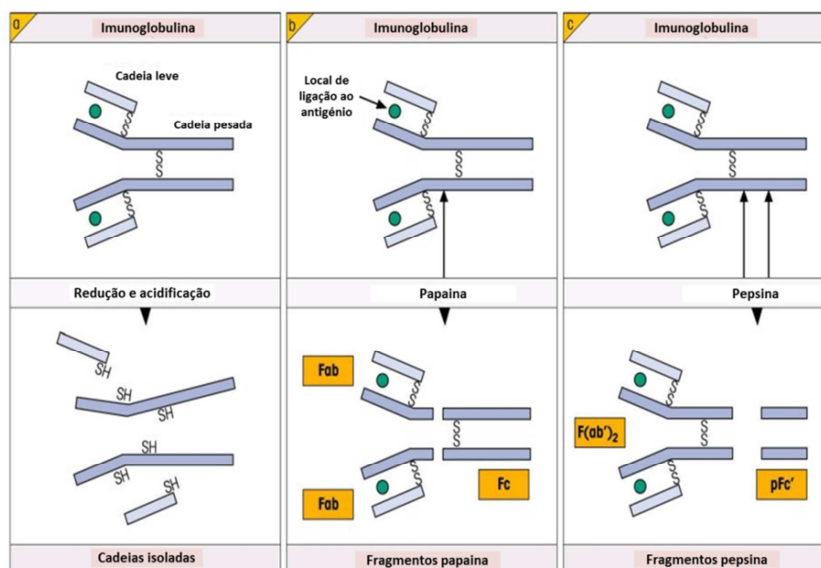


Figura 7 – Quebra da molécula de anticorpo

Fonte: Delves, P, et al. Roitt's Essential Immunology. 12ª Edição. New York: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN: 978-1-4051-9683-3

As imunoglobulinas possuem uma zona móvel denominada *hinge* (dobradiça), que permite ao anticorpo uma mudança de ângulo de orientação de modo a existir uma maior capacidade de ligação ao antígeno⁽³⁸⁾ - Figura 8.

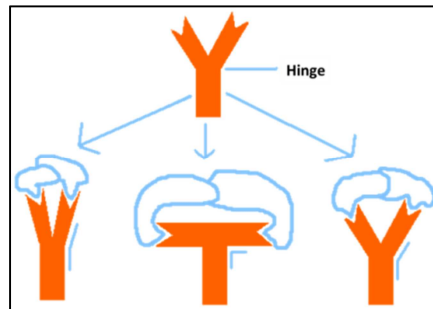


Figura 8 – Zona de hinge do anticorpo

Fonte: http://www.odec.ca/projects/2003/lange3c/public_html/hinge.gif

Nas cadeias leves e pesadas existem três tipos de zonas - Figura 9:

- Zonas constantes;
- Zonas variáveis;
- Zonas hipervariáveis.

A zona constante da cadeia pesada determina o tipo de cadeia pesada em questão e consequentemente o tipo de imunoglobulina. A zona constante da cadeia leve determina o tipo de cadeia leve em questão. As zonas variáveis são as zonas de ligação do anticorpo e as zonas hipervariáveis estão localizadas dentro destas, sendo responsáveis pela ligação altamente específica a um antígeno⁽³⁵⁾.

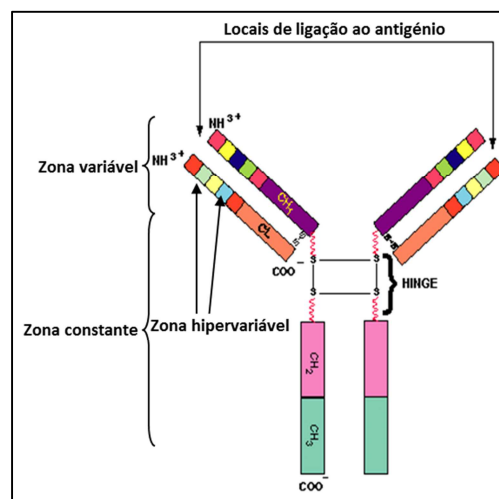


Figura 9 – Localização das diferentes zonas estruturais do anticorpo.

Fonte: <http://biobest.com.au/bionews/wp-content/uploads/2011/10/Antibody.jpg>

A distribuição das zonas hipervariáveis ocorre tipicamente entre os aminoácidos 31-37, 86-91 e 101-110 na cadeia pesada e entre os aminoácidos 23-34, 50-56 e 89-97 na cadeia leve. Enquanto as ligações dissulfídicas se estabelecem entre os aminoácidos 22-98 na cadeia pesada e 23-98 na cadeia

leve. Isto vai permitir a organização espacial da molécula de anticorpo de modo a expor ativamente as áreas específicas de ligação ao contacto com o antígeno ⁽²⁾ - Figura 10.

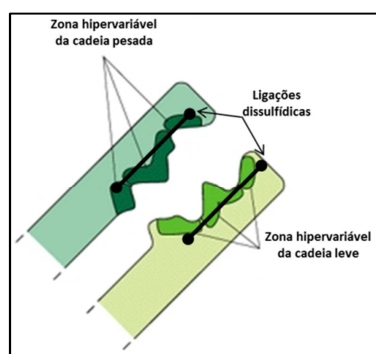


Figura 10 – Interação entre zonas hipervariáveis e ligações dissulfídicas do anticorpo.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28374/bin/ch23f31.jpg>

2.4.6 Cadeias leves

A distribuição de cadeias leves difere em todas as classes e subclasses de imunoglobulinas, bem como entre diferentes espécies animais. Existem cadeias leves kappa e lambda, no entanto, cada anticorpo possui cadeias leves de um só destes tipos ⁽³⁵⁾. No ser humano as cadeias kappa constituem cerca de 65% do total de cadeias leves ⁽³⁸⁾.

2.4.7 Cadeias pesadas

As cadeias pesadas de cada imunoglobulina diferem nas propriedades estruturais e definem a classe e subclasse de cada molécula.

2.4.7.1 Cadeia pesada Alfa

Está presente na imunoglobulina de tipo A (IgA). Existe nas secreções sero-mucosas – saliva, lágrimas, suor, corrimento nasal ou secreções gastrointestinais, onde possui funções de defesa contra o ataque por micro-organismos. Existe nestes líquidos sob a forma de dímero estabilizado contra a proteólise por combinação com outra proteína (o componente secretor), sintetizado por células epiteliais e que possui uma cadeia peptídica simples. A dimerização é efetuada por conjugação com uma outra cadeia proteica (cadeia J) ⁽²⁾ - Figura 11. Tem como função principal ligar-se aos micro-organismos, diminuindo a sua capacidade de aderência às células epiteliais, impedindo assim a sua entrada. Possui duas subclasses com diferentes ligações dissulfídicas: IgA₁, IgA₂ ⁽³⁶⁾.

2.4.7.2 Cadeia pesada Gama

Está presente na imunoglobulina de tipo G (IgG) que é a imunoglobulina que existe em maior quantidade e possui capacidade de atravessar a barreira placentária: passa da mãe para o feto e defende-o nas primeiras semanas de vida. É a imunoglobulina com maior capacidade de difusão, sendo a primeira responsável pela neutralização imediata das toxinas bacterianas e pela promoção da fagocitose.

Existem 4 subclasses – IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ – possuindo, cada uma delas, cadeias pesadas ligeiramente diferentes, na constituição por aminoácidos e nas ligações dissulfídicas - Figura 11. Caracterizam-se por possuir diferentes concentrações serológicas ao longo da vida do ser humano ⁽³⁵⁾.

2.4.7.3 Cadeia pesada Delta

Pode ser encontrada na imunoglobulina de tipo D (IgD) que foi a última a ser descoberta. Possui menor capacidade de resistência à digestão proteolítica, ao contrário das outras imunoglobulinas, o que explica o seu curto tempo de vida no plasma sanguíneo. Possui uma elevada percentagem de glúcidos e encontra-se na superfície de linfócitos sanguíneos com a função de ativador/inibidor ⁽³⁵⁾ - Figura 11.

2.4.7.4 Cadeia pesada Miu

Encontra-se na imunoglobulina de tipo M (IgM). As moléculas de IgM são polímeros de 5 unidades de anticorpos, unidos por uma cadeia J - Figura 11. Existe principalmente na corrente sanguínea e possui principal apetência para antigénios com vários epítomos. Tem alta capacidade citolítica e resposta rápida, estando envolvida nos casos de resposta a bacterémia ⁽³⁵⁾.

2.4.7.5 Cadeia pesada Epsilon

Está presente na imunoglobulina de tipo E (IgE), existindo em baixa proporção no organismo humano. Forma uma segunda barreira de defesa contra o ataque de micro-organismos nas superfícies externas do organismo. Está presente em afeções por parasitas e é responsável por alguns dos sintomas de alergia atópica - reação inflamatória ⁽³⁶⁾ - Figura 11.

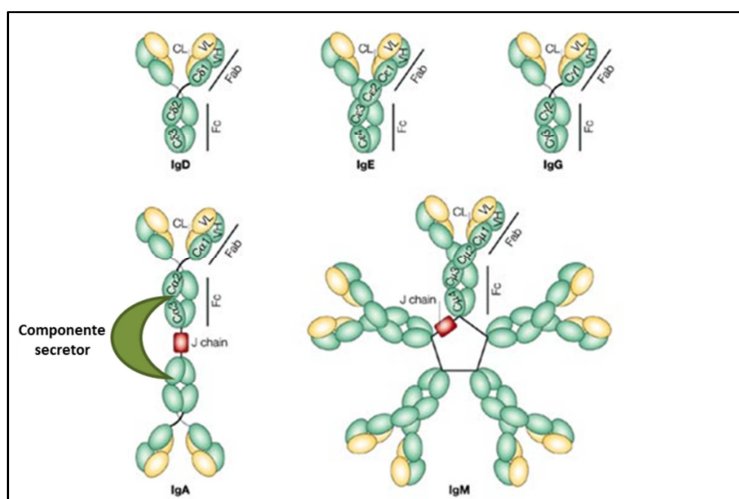


Figura 11 – Estrutura esquemática das diferentes imunoglobulinas

Fonte: http://www.nature.com/nrm/journal/v3/n12/box/nrm972_BX1.html

2.4.8 Forças de ligação entre antígeno e anticorpo

Todas as forças de atração entre antígeno e anticorpo possuem em comum a necessidade de proximidade entre moléculas para se criarem, podendo ser de quatro tipos ^(2; 37): eletrostáticas, pontes de hidrogénio, hidrofóbicas e forças de van der Waals. Nenhum destes tipos de força é muito robusto,

mas, quando combinados, conseguem estabelecer ligações bastante fortes. A contribuição que cada um destes tipos de força confere depende do tipo e da localização dos aminoácidos que se encontram no antigénio e no anticorpo⁽³⁷⁾.

2.4.8.1 Ligação eletrostática ou iónica

É um tipo de ligação química baseada na atração eletrostática entre dois iões carregados com cargas opostas. Na formação da ligação iónica, um átomo doa um eletrão, devido à sua baixa eletronegatividade, formando um ião positivo ou catião. O elemento recetor adquire então carga negativa tornando-se um anião. Estes dois elementos podem então estabelecer entre si uma ligação eletrostática ou iónica⁽³⁹⁾ - Figura 12.

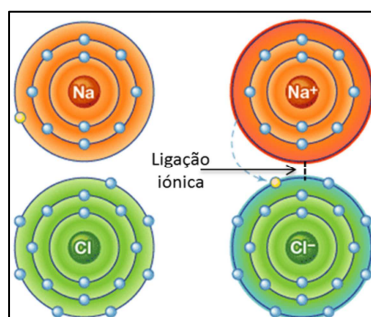


Figura 12 – ligação eletrostática (iónica)

Fonte: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/92139/Ionic-bond-An-atom-of-sodium-donates-one-of-its>

2.4.8.2 Pontes de hidrogénio

São relativamente fracas e reversíveis e formam-se entre grupos hidrofílicos como OH e NH₂ e COOH, dependendo da proximidade das duas moléculas que transportam estes grupos. São fortemente condicionadas pela elevada eletronegatividade dos elementos envolvidos, que aglomeram junto a si a nuvem eletrónica da molécula a que pertencem e criam polos de cargas contrárias que podem atrair moléculas adjacentes no mesmo estado⁽³⁹⁾ - Figura 13.

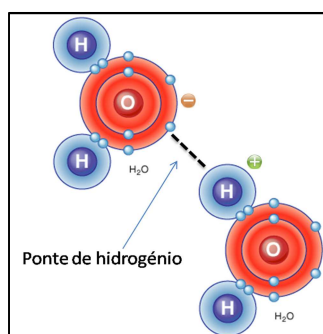


Figura 13 – ligação por ponte de hidrogénio

Fonte: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/92139/Ionic-bond-An-atom-of-sodium-donates-one-of-its>

2.4.8.3 Ligações hidrofóbicas

Da mesma forma que as gotas de óleo na água podem juntar-se todas numa só, grupos hidrofóbicos não polares tendem a fazer o mesmo. Se dois grupos hidrofóbicos de 2 proteínas se aproximarem o suficiente, de forma a excluírem todas as moléculas de água entre elas, a superfície em contacto com

a água é reduzida e as proteínas adquirem um estado de energia mais baixo (menor entropia) do que aquele que existia enquanto estavam separadas, ou seja, surge uma atração entre elas. Estima-se que as forças hidrofóbicas contribuem em mais de 50% da força total da ligação antígeno-anticorpo⁽²⁾ - Figura 14.

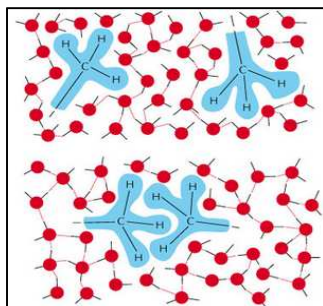


Figura 14 – Ligações hidrofóbicas

Fonte: <http://ak47boyz90.wordpress.com/page/59/>

2.4.8.4 Forças de van der Waals

Estão ligadas a perturbações temporárias da nuvem de elétrons de uma molécula, que podem formar um dipolo elétrico que induz uma perturbação dipolar em outra molécula adjacente, podendo assim os dois dipolos estabelecer uma força de atração entre eles⁽³⁹⁾ - Figura 15.

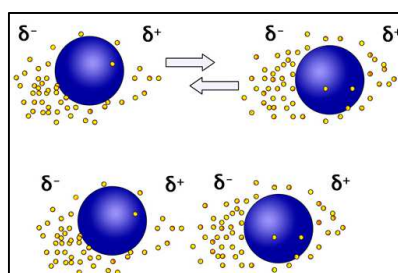


Figura 15 – Ligações por forças de van der Waals

Fonte: <http://www.planet-schule.de/wissenspool/total-phaenomenal/inhalt/hintergrund/klebekuenstler.html>

2.5 Soros de anticorpos

Para realização das técnicas imunocitoquímicas é fundamental possuir reagentes adequados, dos quais se destaca o soro de anticorpos. Este produto é obtido após imunização de animais-alvo, dos quais são posteriormente obtidos, por via direta ou indireta, os anticorpos produzidos. Existem assim dois tipos de soros de anticorpos, que se distinguem pela forma de produção: soros policlonais e soros monoclonais.

2.5.1 Soros policlonais

Os soros policlonais possuem anticorpos produzidos por vários plasmócitos, reagindo assim com diversos epítomos de um antígeno - Figura 16. O animal mais utilizado para a produção de soros policlonais é o coelho, mas podem ser utilizados cabra, porco ou ovelha, entre outros, tratando-se sempre de animais cujo sistema imunitário está bem documentado⁽⁴⁰⁾.

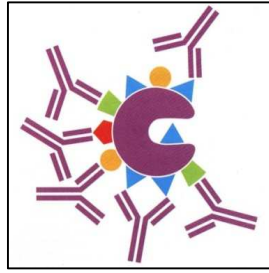


Figura 16 – Soro policlonal

Fonte: http://www.dako.com/dist/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf

A seqüência habitual de produção inicia-se na escolha do antígeno e sua injeção no animal-alvo de forma a obter-se uma resposta imunitária, e termina na obtenção de um soro purificado com vários anticorpos diferentes dirigidos para os vários epítomos do antígeno⁽²⁾ - Figura 17.

Existem três tipos de soros policlonais diferenciados pela etapa de seleção e purificação em que se encontram⁽³⁶⁾:

- Soro total (*whole serum*) obtido após extração dos elementos celulares;
- Soro de fração de imunoglobulinas (*Ig fraction*) obtido após extração das proteínas (excepto imunoglobulinas);
- Soro de afinidade Isolada (*Affinity isolated antibodies*) obtido após extração das imunoglobulinas não específicas para o antígeno pretendido.

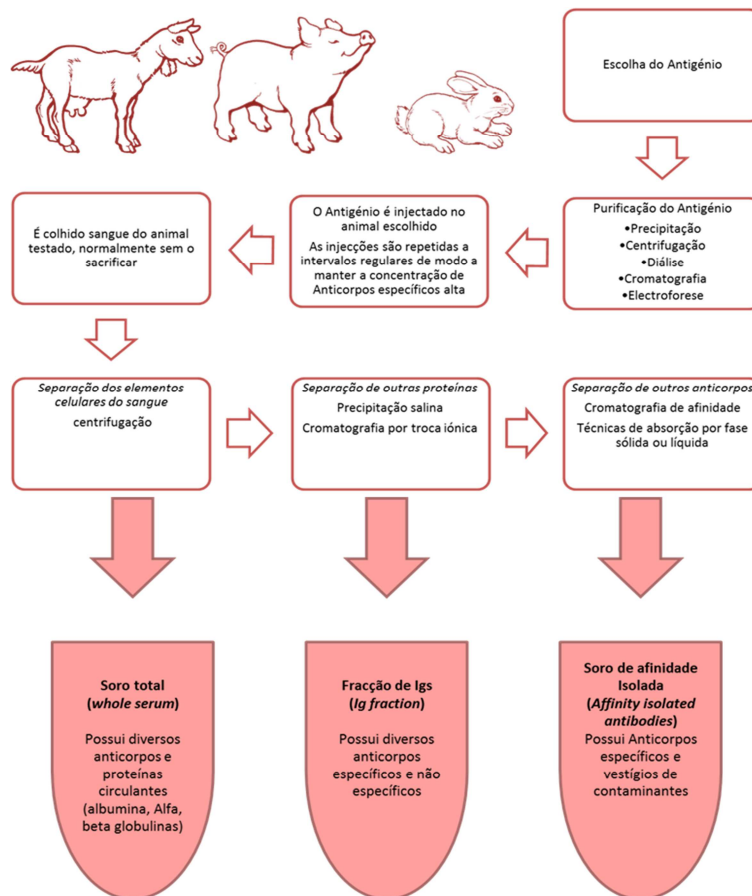


Figura 17 – Produção de soro policlonal

A qualidade deste soro é diretamente proporcional à qualidade das técnicas de purificação. O uso de animais de laboratório mantidos em ambiente altamente higienizado (pouco exposto a microorganismos) facilita a obtenção de soros com poucos anticorpos contaminantes previamente desenvolvidos pelo animal contra outros antígenos ⁽³⁶⁾.

2.5.2 Soros monoclonais

Um soro monoclonal é o reagente que é produto de um único clone de plasmócitos imortalizados e que, como tal, é uniforme em estrutura, especificidade e afinidade, podendo ser produzido em relativa grande quantidade. Os anticorpos de um determinado clone são imunologicamente idênticos e reagem com um determinado epítipo de um antígeno, contra o qual foram produzidos - Figura 18. O animal mais utilizado para obter clones de anticorpos é o ratinho ^(2; 36).

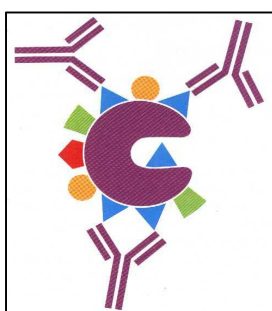


Figura 18 – Soro monoclonal

Fonte: http://www.dako.com/dist/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf

Estes reagentes revolucionaram muitas áreas de trabalho experimental, industrial e clínico, tendo proporcionado um Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia em 1984 aos seus maiores impulsionadores George Kohler e Cesar Milstein ⁽⁴¹⁾ - Figura 19.



Figura 19 - Milstein e Kohler

Fonte: <http://sachemdisplacementchromatography.typepad.com/.a/6a012876728c57970c013482986309970c-pi>

A técnica mais utilizada para a produção de soros monoclonais consiste, resumidamente, nos seguintes passos ^(2; 35) - Figura 20:

1. Imunização de um animal de modo a serem produzidos anticorpos para um determinado antígeno que é introduzido por injeções repetidas.
2. Colheita de plasmócitos no baço desse animal.
3. Fusão desses plasmócitos (curto tempo de vida) com células de mieloma (longo tempo de vida).

4. Colocação das células resultantes da fusão em cultura de modo a poder recolher-se os anticorpos por elas produzidos.
5. Testes para os anticorpos em causa, no sentido de se saber quais as suas características.
6. Manutenção das culturas (clones) que demonstrem características úteis e destruição das restantes.
7. Recolha sistemática dos anticorpos produzidos pelo clone que passam a constituir o soro monoclonal.

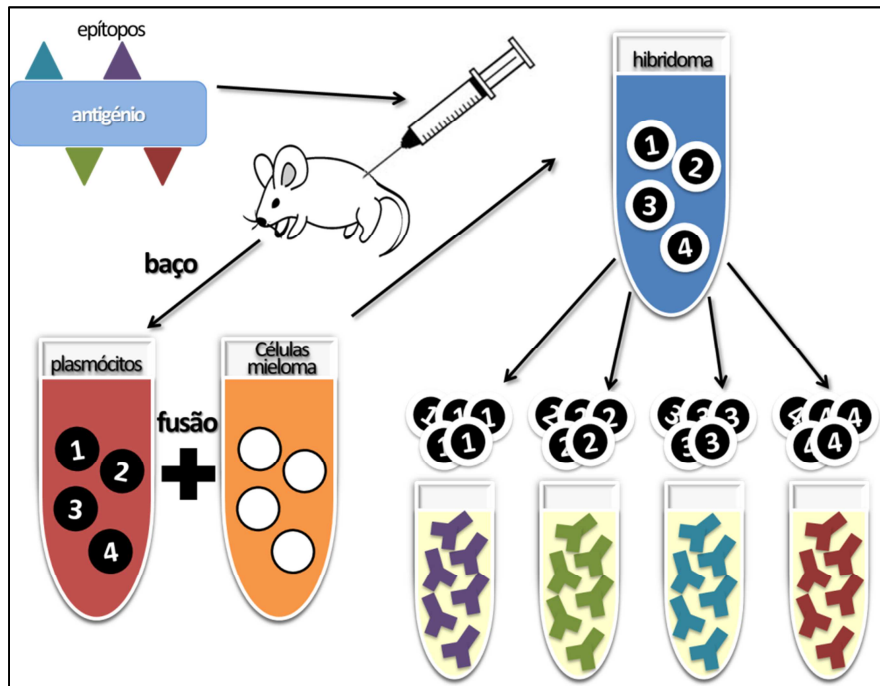


Figura 20 – Produção de soros monoclonais.

O método mais utilizado na fusão dos plasmócitos com as células de mieloma recorre ao polietileno-glicol (PEG) como diminuidor da tensão superficial entre as membranas celulares das células do mieloma e as células do baço do animal utilizado, que, entretanto foi sacrificado para permitir a sua retirada. Uma vez diminuída a tensão superficial as células fundem as suas membranas celulares/nucleares e numa posterior mitose fundem o seu ADN, o que resulta numa célula híbrida que mantém a imortalidade de uma célula-mãe e a capacidade de produzir anticorpos específicos da outra célula-mãe. No entanto, após a fusão não se obtém somente as células híbridas. Teremos também plasmócitos não hibridados (que morrem em pouco tempo) e células de mieloma não hibridadas, que são eliminadas pela adição ao meio de cultura de HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina), pois não possuem enzimas para contornar o efeito destes elementos tóxicos.

As células híbridas proliferam e dão origem a clones. Posteriormente os anticorpos produzidos são testados por etapas até se individualizarem clones produtores de anticorpos para o epítipo pretendido. O sobrenadante da cultura celular rico em anticorpos é assim regularmente recolhido e comercializado pelo seu produtor. Existe ainda a hipótese de inocular o clone de células na cavidade abdo-

minal de um ratinho e recolher regularmente o líquido ascítico que se desenvolve e que é muito rico em anticorpos específicos^(2; 35).

2.5.3 Soros monoclonais versus soros policlonais

Cada um dos tipos de soros referidos anteriormente possui vantagens e desvantagens quando comparado com o outro tipo. Os soros monoclonais destacam-se por possuírem alta especificidade e homogeneidade enquanto os policlonais são geralmente menos dispendiosos e mais fáceis de obter -

Tabela 5.

Soros Monoclonais	Vantagens	Alta especificidade
		Alta afinidade
		Determinação de um só epítipo de um antígeno
		Alta homogeneidade
		Ausência de anticorpos não específicos
		Maior facilidade de caracterização
		Baixa variabilidade de lote para lote
Desvantagens	Alto custo relativo	
	Identificação de só um epítipo de um antígeno. Esse epítipo pode estar destruído mesmo que exista a molécula total do antígeno	
	Se o soro não foi produzido contra um epítipo específico do antígeno que se quer detetar e se existirem outros antígenos com esse epítipo, a grande vantagem da alta especificidade será inútil	
	Relativa dificuldade de obtenção em grandes quantidades	
Soros Policlonais	Vantagens	Baixo custo relativo
		Capacidade para detetar um antígeno mesmo na ausência de vários dos seus epítipos
		Relativa facilidade de obtenção em grandes quantidades
	Desvantagens	Relativa baixa especificidade
		Determinação de vários epítipos que podem pertencer a vários antígenos
		Relativa baixa homogeneidade
		Possibilidade de presença de anticorpos não específicos
Maior dificuldade de caracterização		
Relativa alta variabilidade de lote para lote		

Tabela 5 – Vantagens e desvantagens de soros policlonais e monoclonais

2.5.4 Diluição de soros de anticorpos

Existem no mercado diversos soros sob a forma pré-diluída que permitem aplicação imediata, mas a margem de manobra que facultam é limitada - Figura 21. A maior parte dos anticorpos são comercializados sob a forma concentrada e é necessário proceder à sua diluição para posterior aplicação. A apresentação concentrada dos anticorpos é a ideal para a adaptação personalizada de cada laboratório com as suas características pré-analíticas específicas, sendo assim possível contornar condições de fixação e de processamento que, por vezes, se encontram longe das ideais.



Figura 21 – Soros pré-diluídos

Fonte: http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/cdg/products/autoimmune/product_detail/global/aibu_29403_pdp.jpg

2.5.4.1 A diluição ideal

É considerada diluição ideal de um soro a diluição que permite a maior intensidade de marcação com o menor fundo possível. A diluição representa-se por: X/Y; sendo que X= [partes de soro concentrado] e Y= [partes de solução final]. Exemplos de diluições usuais são: 1/20; 1/1000; 1/5000.

2.6 Preparação de amostras para imunohistoquímica

Quando se pretende proceder a estudos imunohistoquímicos é essencial garantir a preservação adequada da amostra e dos seus antigénios alvo, para além de se preparar as células/tecidos para visualização em microscópio ótico. Nesse sentido, o mais usual é proceder-se à fixação química da amostra e ao seu subsequente processamento laboratorial e microtomia, com vista à obtenção de um corte histológico íntegro e facilmente visualizável em microscopia.

2.6.1 Fixação

A fixação é uma das mais importantes fases da preparação da amostra, sabendo-se que a sua principal finalidade é manter as células e os tecidos o mais próximo possível das características *in vivo*⁽⁴²⁾, assegurando^{(32) (43)}:

- Preservação - as enzimas endógenas e a flora microbiana ficam impedidas de destruir o tecido;
- Estabilização - a estrutura molecular do tecido é estabilizada;
- Proteção – o fixador protege ainda os tecidos e as células das agressões do procedimento histológico e coloração.

O formaldeído tem sido o fixador mais utilizado nos laboratórios de Anatomia Patológica, pois é bastante económico e possui grande poder de penetração nos tecidos, preservando os detalhes morfológicos com artefactos de retração reduzidos⁽³²⁾. No entanto, este químico provoca algumas alterações estruturais nas biomoléculas, principalmente nas proteínas, que, por sua vez, constituem o principal alvo das identificações imunohistoquímicas.

2.6.1.1 Formaldeído

Quimicamente, o formaldeído é o mais simples dos aldeídos e tem a denominação da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) de metanal. Possui a fórmula química H₂CO e apresenta-se, em condições normais de pressão e temperatura, como um gás incolor de cheiro característico e penetrante, sendo tóxico e carcinogénico humano documentado⁽⁴⁴⁾. É normalmente comercializado sob a forma de gás a 37%-39% em solução aquosa, a que se dá o nome de formol ou formalina. Na utilização em Anatomia Patológica o fixador mais utilizado é o formol a 10% que pode ser tamponado para manter o pH estável⁽³²⁾.

Ao nível celular o formaldeído parece possuir a capacidade de fomentar o estabelecimento de pontes de metileno entre os aminoácidos de várias proteínas, alterando a sua forma e contribuindo para a sua inativação funcional - Figura 22.

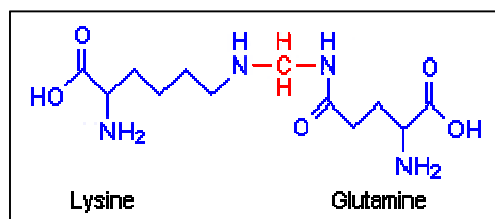


Figura 22 – Ponte de metileno entre aminoácidos.

Fonte: <http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/agents/formalin.htm>

O formaldeído fomenta assim alterações na conformação das proteínas que resultam na inativação das enzimas, sabendo-se que os compostos resultantes dos processos de fixação diferem dos compostos iniciais nos aspetos químicos e estruturais, e conseqüentemente nas características dos antígenos teciduais. Por conseguinte, pode dizer-se que, apesar de ser um passo indispensável na técnica histológica, a fixação afeta diretamente a imunohistoquímica, podendo “mascarar” alguns antígenos e impedir o seu reconhecimento pelo anticorpo⁽²⁾.

O formaldeído pode reagir com um epítipo antigénico mascarando-o diretamente ou pode também reagir com os aminoácidos envolventes do epítipo alterando a sua forma e mascarando-o indiretamente⁽⁴²⁾ - Figura 23.

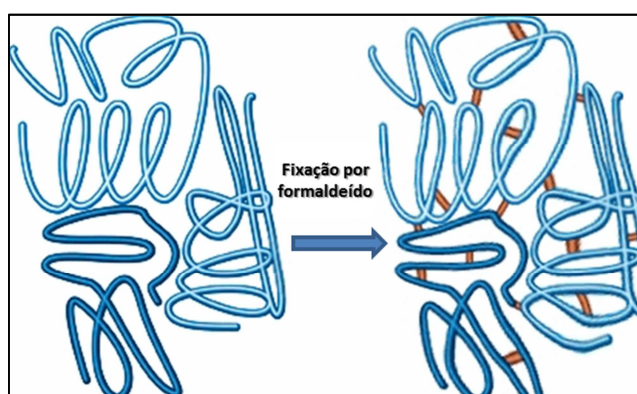


Figura 23 – Alteração estrutural em proteínas fixadas por formaldeído.

Fonte: http://www.nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/94

Estudando uma outra via, Shi e seus colaboradores sustentam a hipótese de que a sensibilidade de alguns epítipos não é devida somente ao efeito direto do aldeído mas sim à ligação de outros elementos ao epítipo, como, por exemplo, iões metálicos de que é exemplo habitual o cálcio - Ca^{2+} ⁽⁴⁵⁾. Apesar de tudo, estas alterações podem, em boa medida, ser revertidas através do aquecimento dos cortes histológicos a alta temperatura em soluções específicas. Este procedimento denomina-se recuperação antigénica (*antigen retrieval*)⁽⁴⁶⁾. Segundo Werner, Von Wasielewski e Komminoth⁽³⁾:

The pretreatment of paraffin sections from formalin-fixed tissues by heat in the presence of appropriate buffers resulted in retrieval of antigens that were previously either undetectable or only weakly visualizable.

Apesar de causar efeitos adversos, o formaldeído continua a ser o fixador mais utilizado em histopatologia por fornecer uma boa preservação morfológica e ser menos dispendioso que outros fixadores alternativos. Acresce ainda que, devido ao longo historial do uso deste químico, foi com recurso aos tecidos por si fixados que foi estabelecida a maior parte dos critérios em uso para diagnóstico, prognóstico e indicação terapêutica ⁽⁴⁷⁾.

Em última análise importa ainda referir que, apesar dos epítomos ocultados pelo formaldeído podem ser recuperados através de métodos diversos, o sistema de amplificação de imunohistoquímica deverá sempre ser sensível e específico o suficiente para dar um sinal forte e inequívoco ⁽⁴⁾.

2.6.2 Processamento histológico

Se o fragmento estiver corretamente fixado, um processamento histológico consistindo em desidratação, diafanização e impregnação de parâmetros normais não terá grande impacto na qualidade antigénica dos tecidos. No entanto, podem surgir alterações ao nível dos antigénios, principalmente devido ao aquecimento do tecido na impregnação e inclusão ⁽²⁾.

Normalmente, os referidos passos do processamento histológico são realizados com recurso a um equipamento próprio, denominado processador de tecidos - Figura 24.



Figura 24 – Processador automático de tecidos

Fonte: http://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20PELORIS/Brochures/Leica_Peloris_Brochure_EN.pdf

2.6.3 Preparação de lâminas

Quando sujeitas às lavagens da técnica de imunohistoquímica e à recuperação antigénica, os cortes podem descolar da lâmina, perdendo-se assim trabalho e tempo, por vezes essencial ao doente ⁽⁴⁸⁾. Isto implica que, por regra, as lâminas de vidro utilizadas em imunohistoquímica são sujeitas a um tratamento prévio que permite um aumento da força de ligação com os cortes.

Tendo em conta que a carga elétrica dos tecidos é maioritariamente negativa (ADN, grupos fosfato, iões monovalentes, entre outros), ao fornecer às lâminas uma carga oposta (positiva) torna-se mais fácil o estabelecimento de ligações entre o tecido e a sílica do vidro da lâmina ⁽²⁾. Este procedimento baseia diversas metodologias de adesivação das lâminas: histobond®, superfrost plus®, silanização, entre outros.

2.6.4 Microtomia

Os cortes para imunomarcção (Figura 25) deverão ser o mais finos possível (2-4 μ m) e não deverão possuir pregas ou estrias que facilitam o descolar nas lavagens e recuperação antigénica⁽²⁾. É importante que estejam colocados numa posição central da lâmina, que por sua vez deve ter esmerilados de boa qualidade para que não se apaguem os números de registo. Após o corte, as lâminas permanecem o tempo necessário na estufa para que o tecido adira à lâmina (por exemplo: 20 minutos a 80°C).



Figura 25 – Cortes de parafina

Fonte: http://www.leica-microsystems.com/uploads/pics/KNIFE_Angle_Microtomy.png

2.7 Recuperação antigénica

No ano de 1974, Taylor, Hambridge e Burns defenderam a importância da aplicação da imunohistoquímica a cortes de parafina, procedimento que não era feito até então, indicando que esse passo traria uma verdadeira revolução na anatomia patológica⁽⁴⁹⁾. No entanto, o desejo destes autores esbarrou num obstáculo: a maioria dos antigénios investigados são significativamente influenciados pela fixação em formaldeído que provoca alterações conformacionais dos epítomos⁽⁵⁰⁾.

Para ultrapassar esse problema, após alguns anos de investigação, estabeleceu-se que alguns métodos de tratamento dos tecidos podem levar à reorganização proteica e devolver quase toda a estrutura tridimensional da proteína à sua configuração nativa⁽⁵⁰⁾. Estava dado o primeiro passo na recuperação antigénica ao demonstrar-se que as alterações conformacionais dos epítomos não eram irreversíveis, como era teoria até então⁽³⁾, desde que as proteínas mantenham a sua estrutura primária fornecida pelo conjunto de aminoácidos⁽⁵¹⁾.

A introdução de métodos de recuperação antigénica, que começou com a aplicação da digestão proteolítica dos cortes histológicos, foi um dos principais avanços que permitiram o desenvolvimento da imunohistoquímica, pois até ao seu aparecimento somente uma pequena percentagem de antigénios podia efetivamente ser detetada. A posterior utilização da recuperação antigénica por alta temperatura facultou um avanço determinante pois permitiu um aumento drástico de substâncias detetáveis nos tecidos ou células e possibilitou a consolidação das metodologias imunohistoquímicas tanto ao nível do diagnóstico, como do prognóstico, como da indicação terapêutica.

2.7.1 Digestão enzimática

Em 1975, Huang ⁽⁵²⁾ refere que a utilização da digestão enzimática, com enzimas proteolíticas, nos cortes de parafina, permite evidenciar antígenos mascarados pela fixação. Estas enzimas digerem as proteínas envolventes do epítipo, tornando possível o seu reconhecimento pelo anticorpo ⁽⁵²⁾. No entanto, este tratamento enzimático nem sempre é eficaz: muitas vezes não consegue recuperar os epítipos em estudo ou os epítipos são, eles próprios, digeridos pelas proteases, conduzindo deste modo a resultados falsos negativos ⁽³²⁾.

2.7.2 Alta temperatura

A recuperação antigénica por alta temperatura consiste no aquecimento a alta temperatura de cortes histológicos de modo a recuperar a antigenicidade que foi obstruída pela fixação em formaldeído ⁽⁵³⁾.

Na década de 40 Fraenkel-Conrat e seus colaboradores ⁽⁵⁴⁾ realizaram diversos estudos bioquímicos sobre as interações entre o formaldeído e as proteínas, demonstrando que as ligações induzidas podiam ser destruídas por aquecimento a altas temperaturas ou por tratamento em soluções alcalinas fortes. Muito posteriormente, em 1991, estudos efetuados por Shi e colaboradores permitiram um grande avanço nas investigações sobre a recuperação antigénica ao descobrirem que o processamento das lâminas de imunohistoquímica a alta temperatura quando mergulhadas em soluções específicas é um fator muito importante e eficaz nesta técnica. Estes investigadores demonstraram ⁽⁴⁶⁾:

“A dramatic enhancing effect of this treatment on the recovery of many antigens, which is particularly intriguing in view of the presumed deleterious effects of high temperatures on protein antigens.”

Apesar de se saber que as proteínas desnaturam entre os 70°C e os 90°C, verifica-se que nos tecidos fixados, elas resistem à desnaturação a estas temperaturas ⁽⁵⁵⁾. Muitos outros investigadores puderam comprovar esta descoberta, nomeadamente, Kawai e colaboradores ⁽⁵⁶⁾ que concluíram que a recuperação antigénica a 90°C durante 10 minutos é mais eficaz do que a 60°C durante 120 minutos. Em 1993, Cattoretti e colaboradores ⁽⁵⁷⁾, confirmam a eficácia desta técnica e propõem alternativas à solução de recuperação antigénica de metais pesados, utilizada até então. A partir dessa altura, a solução de tampão citrato 0,01M a pH 6.0 passou a ser a solução de recuperação antigénica mais utilizada. No entanto, posteriormente, verificou-se que não existe uma única que se adegue de forma universal a todos os tipos de antígenos ⁽²⁾. Assim, devem-se testar os vários anticorpos, até serem encontradas as condições ideais de recuperação antigénica.

Outro fator muito importante é o pH das soluções utilizadas. De acordo com Shi e colaboradores ⁽⁵⁸⁾:

“...in addition to high-temperature heating, the pH of the Antigen Retrieval solution influences the degree of unmasking of epitopes.”

Alguns investigadores chegam mesmo a afirmar que o valor do pH de uma solução de recuperação antigénica é mais importante do que a composição química da mesma, principalmente para antigénios nucleares e de membrana celular⁽⁵⁸⁾.

A existência de agentes quelantes (promovem a extração dos iões cálcio do tecido) também afeta de algum modo a recuperação antigénica^(59; 60), surgindo antigénios com preferência por determinados agentes quelantes, normalmente o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) entre outros - Figura 26.

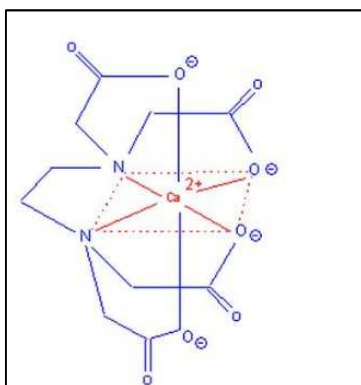


Figura 26 – Reação entre Ca^{2+} e EDTA

Fonte: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/catalysis/olmethodscat.html>

De um modo geral, as soluções de recuperação antigénica mais difundidas atualmente são:

- Tampão EDTA 1mM pH 8.0 (Apêndice 1);
- Tampão citrato pH 6.0 (Apêndice 2);
- Tampão Tris-EDTA pH 9.0 (Apêndice 3).

Como forma de obtenção de alta temperatura foram testados vários métodos, tais como: forno de micro-ondas⁽⁴⁶⁾, autoclave^{(61) (62) (63) (64)}, panela de pressão^{(65) (66)}, banho de água quente⁽⁵⁶⁾ e vapor quente^{(67) (68)}. Destes, os mais utilizados atualmente, são o micro-ondas e a panela de pressão, sendo ambos bastante semelhantes e eficazes. Se por um lado a panela de pressão exige um maior consumo de solução tampão relativamente ao micro-ondas, por outro lado, o micro-ondas obriga a uma maior duração do processamento. Para a recuperação térmica em forno micro-ondas é utilizada frequentemente uma potência de 750W durante 15/20 minutos e para a panela de pressão o processamento normalmente dura 3/4 minutos à pressão máxima. Em qualquer destes procedimentos a morfologia geral do tecido não é, regra geral, particularmente afetada.

2.8 Enzimas em imunohistoquímica

Dá-se o nome de imunoenzimologia aos métodos de imunohistoquímica que utilizam enzimas, como substâncias propiciadoras da visualização do antigénio. São os métodos mais utilizados atualmente, pois permitem a visualização, em microscópio ótico, da estrutura geral do tecido em simultâneo com a marcação imunohistoquímica. Além disso possibilitam, regra geral, a obtenção de preparações histológicas permanentes⁽²⁾.

Os métodos de marcação imunoenzimáticos utilizam reações do tipo enzima-substrato para obter produtos finais coloridos a partir de cromogêneos específicos⁽²⁾.

2.8.1 Horseradish Peroxidase (HRP)

A enzima mais utilizada é a HRP⁽⁶⁹⁾ obtida da raiz do rábano *Armoracia rusticana* - Figura 27. Esta molécula possui características muito vantajosas⁽²⁾:

- Existe em grandes quantidades na natureza numa forma altamente pura e pouco dispendiosa;
- A sua conjugação não anula a atividade enzimática;
- Os produtos da reação enzimática são facilmente detetados e permanecem estáveis durante longos períodos.

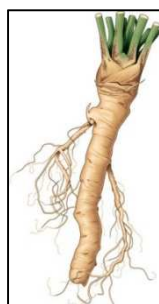


Figura 27 – Horseradish

http://content.answcdn.com/main/content/img/wiley/visualfood/27_HerbesEpicesCondiments/40758-RacineRaifort.jpg

A HRP pode ser dividida em mais de 30 isoenzimas, sendo que a forma predominante é a isoenzima C (HRP C), uma glicoproteína monomérica com peso molecular de aproximadamente 44 kDa. É caracterizada como uma única cadeia de polipeptídeo com 308 resíduos, com um resíduo N-terminal bloqueado por piroglutamato. É fortemente glicosilada (18% em massa) e contém um único grupo de protoporfirina IX como grupo prostético, dois íons de cálcio, quatro pontes dissulfeto, e oito cadeias de carboidratos *N-linked*. Contém um grupo de base férrica (hematina) no seu centro ativo (Figura 28), possuindo, em solução, cor castanha⁽⁷⁰⁾.

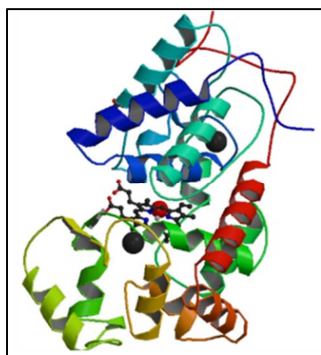


Figura 28 – Estrutura tridimensional da HRP. O grupo heme está localizado no centro com o átomo de ferro a vermelho e os íons de cálcio são as esferas pretas

Fonte: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1HCH>

A hematina da peroxidase forma um complexo com o peróxido de hidrogénio (substrato) provocando a sua decomposição em água (H_2O) e oxigénio atómico ⁽²⁾. A peroxidase também pode oxidar outras substâncias como os nitratos e os polifenóis ⁽⁴²⁾.

2.8.1.1 Substratos e Cromogéneos

A HRP, em presença de peróxido de hidrogénio, forma, numa primeira fase, um complexo enzima-substrato, e, posteriormente, oxida um dador de eletrões que permite que a reação prossiga na degradação do peróxido em água e oxigénio livre. Alguns dadores de eletrões uma vez oxidados tornam-se coloridos e portanto são designados cromogéneos. Este facto associado à capacidade de precipitarem no local da reação após a oxidação, torna-os muito úteis em imunohistoquímica, pois permite identificar a presença e localização do antigénio ⁽²⁾.

O cromogénio mais utilizado é a 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB) que gera um precipitado castanho/bronze insolúvel em álcool e noutros solventes orgânicos - Figura 29.

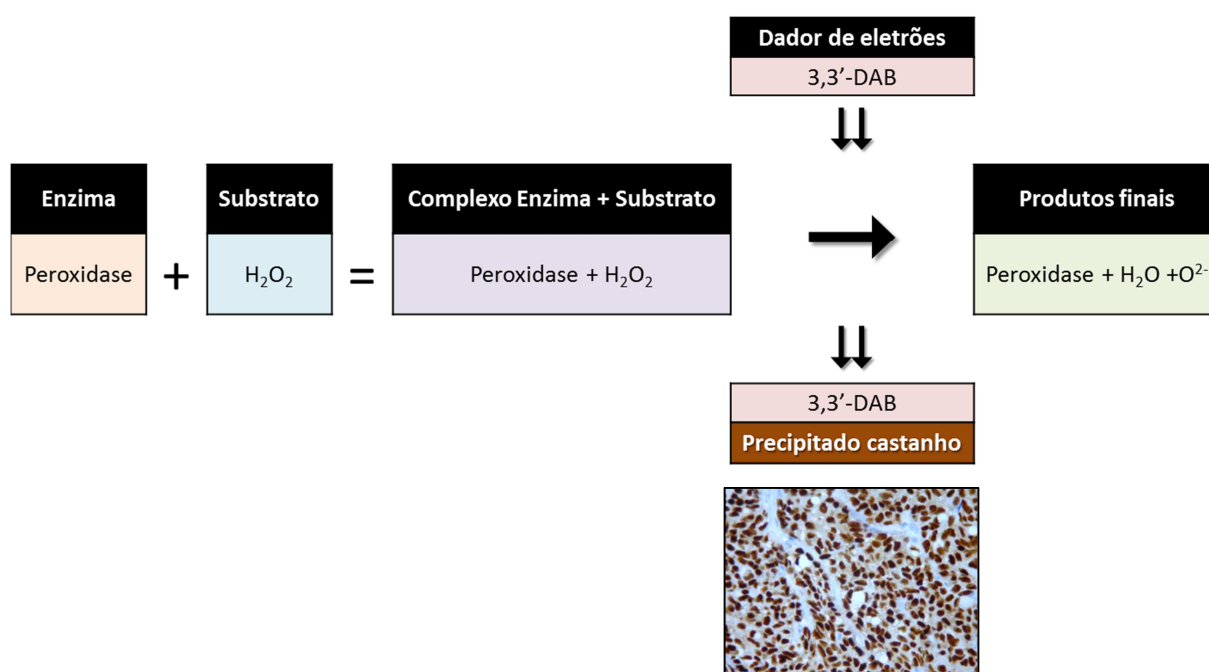


Figura 29 – sequência de revelação da presença da enzima peroxidase por 3,3'DAB

A sua oxidação causa a polimerização, permitindo a reação com o tetróxido de ósmio, aumentando a intensidade da cor e permitindo o surgimento da densidade para os eletrões, útil em microscopia eletrónica ^(47; 51). O composto final pode mudar a sua cor para negro caso seja utilizado, em simultâneo com a oxidação, o cloreto de níquel. Pode também intensificar-se a cor castanha caso seja utilizado, em simultâneo com a oxidação, o sulfato de cobre ⁽⁵¹⁾.

2.9 Inibição de partículas endógenas

Algumas estruturas teciduais, que podem existir em qualquer órgão ou tecido, provocam o aparecimento de marcação inespecífica atraindo indiscriminadamente os anticorpos utilizadas nas técnicas imunohistoquímicas. Estas partículas assumem principalmente a forma de pontos hidrofóbicos e

eletrostáticos, normalmente associados a moléculas proteicas⁽⁴⁷⁾. Deverão ser anuladas ou inibidas utilizando várias técnicas como^{(22) (24)}:

- Utilização de soro normal não imune de uma espécie animal diferente da utilizada para produzir o anticorpo primário, aplicado imediatamente antes do soro primário.
- Utilização de tampão salino de lavagem e de diluição de soros com um detergente (ex. triton X100; tween 20).
- Utilização de tampão salino de diluição de soros com albumina sérica bovina (BSA) a 0.05% ou caseína a 0.4%, com estabilizadores, surfactante e Bronidox L a 0.2% como conservante.

2.9.1 Peroxidase Endógena

Tendo em conta que alguns tecidos humanos possuem naturalmente peroxidase - peroxidase endógena - torna-se necessário inibi-la de forma a garantir que a única peroxidase detetada no tecido é a que está associada ao antígeno. Esse bloqueio é efetivado imediatamente após a desparafinação/hidratação pela adição de excesso de substrato (H_2O_2) que leva à saturação da atividade enzimática e consequente inibição⁽²⁾.

2.10 Contraste

As colorações de contraste são escolhidas tendo em conta a cor do produto final obtido na técnica de imunohistoquímica. Tendo em conta a cor castanha do DAB precipitado, os contrastes mais utilizados atualmente são as hematoxilinas de Harris e Mayer que permitem a obtenção da cor azul.

2.11 Sistemas amplificativos de polímero

Se no início, com Coons, a amplificação de sinal era medíocre, o que limitava a exequibilidade da imunohistoquímica a situações excepcionais e esporádicas, isso não toldou as potencialidades destas técnicas, tendo desde sempre os investigadores procurado identificar quantidades cada vez mais ínfimas de antígeno⁽⁵⁰⁾.

Fruto de uma evolução constante que gerou várias patentes registadas^(71; 72; 73), estão, atualmente, em uso os sistemas de amplificação de polímero que permitem novas abordagens dos conceitos anteriormente utilizados.

2.11.1 Características gerais

Tendo em conta que, através da utilização dos polímeros, existe a possibilidade de conjugar grandes quantidades de marcador (mais vulgarmente HRP) a anticorpos, emerge uma capacidade superior de amplificação que permite detetar mesmo os antígenos teciduais que estejam em baixa quantidade, deslocando bastantes moléculas propiciadoras de visualização por molécula de antígeno⁽²⁾.

Além disso, estes métodos permitem diminuir os custos com anticorpos primários pois facultam um aumento das suas diluições de trabalho sem comprometer a intensidade das marcações. Com maiores diluições de trabalho dos anticorpos primários surgem também outras vantagens, como a forte diminuição das marcações inespecíficas provocadas pelas marcações cruzadas. O facto destes siste-

mas não possuírem (strep)avidina nem biotina torna desnecessária a utilização de reagentes bloqueadores⁽²⁷⁾. Paralelamente permitem ainda a utilização de recuperação antigénica mais vigorosa sem o receio de evidenciar biotina endógena⁽⁷⁴⁾. Os sistemas de polímero possibilitam todas estas vantagens enquanto se beneficia da simplicidade e rapidez de um ensaio de poucas etapas⁽⁴⁷⁾.

De um modo geral os métodos são simples e de rápida execução, tornando menos provável a variabilidade intra-laboratorial, aumentando a reprodutibilidade e a facilidade de padronização, e diminuindo fatores de erro, equívocos e repetições. Para reforçar esta tendência os reagentes são normalmente fornecidos pelo fabricante em formato líquido, pronto a aplicar, com proteína estabilizadora e conservante. Estas características aumentam a qualidade e garantem a diminuição dos custos do trabalho e do tempo técnico e, quando associadas à possibilidade de aumentar diluições dos anticorpos primários, permitem compensar largamente os custos destes reagentes⁽⁴⁷⁾.

2.11.2 Metodologia prática

De um modo geral, o primeiro passo da técnica consiste na aplicação de um anticorpo primário não marcado e a segunda etapa consiste na aplicação de um polímero contendo anticorpos secundários, bem como numerosas moléculas enzimáticas. São estas enzimas que permitem oxidar e precipitar o cromogénio no local exato do antigénio. Como está presente um grande número de enzimas no polímero, maior quantidade de cromogénio será precipitada, o que resulta numa marcação mais intensa e brilhante, aumentando assim a sensibilidade do método, permitindo detetar até as quantidades mais ínfimas de antigénio⁽⁴⁷⁾.

De um ponto de vista muito prático, estes métodos são extremamente úteis, particularmente quando são necessários resultados muito rápidos. Podem, por exemplo, ser aplicados rotineiramente para avaliar, em exame intraoperatório, as margens cirúrgicas de um melanoma através de cirurgia micrográfica de Mohs, detetando melanócitos por via do antigénio MART-1/Melan A. Com este método rápido e sensível surgem benefícios para o doente e para as equipas de cirurgia e patologia, garantindo margens cirúrgicas mais seguras, com todas as consequências que daí advém em mortalidade, morbidade e qualidade de vida⁽⁷⁵⁾.

2.11.3 Sistemas de dois e três passos

Os sistemas de polímero podem possuir só dois passos, ou seja implicar apenas a incubação do anticorpo primário e, posteriormente, do polímero propriamente dito. No entanto, para a deteção de alguns antigénios verificou-se que a intensidade de imunomarcação ficava diminuída e assumiu-se que isso era devido a problemas de penetração nos tecidos do polímero, provavelmente em resultado de impedimento espacial provocado pelo elevado peso molecular dos grandes conjugados poliméricos⁽¹⁸⁾. Para tentar ultrapassar este problema foram criados os sistemas de três passos, nos quais é incluída a aplicação de um anticorpo extra (comummente designado pelos fabricantes como ativador), entre o primário e o polímero, que aumenta a capacidade de deteção do sistema e a sua

sensibilidade ⁽²⁷⁾. Este segundo anticorpo permitirá o aumento da superfície de ligação disponível para a polímero que é colocado *a posteriori* - Figura 32.

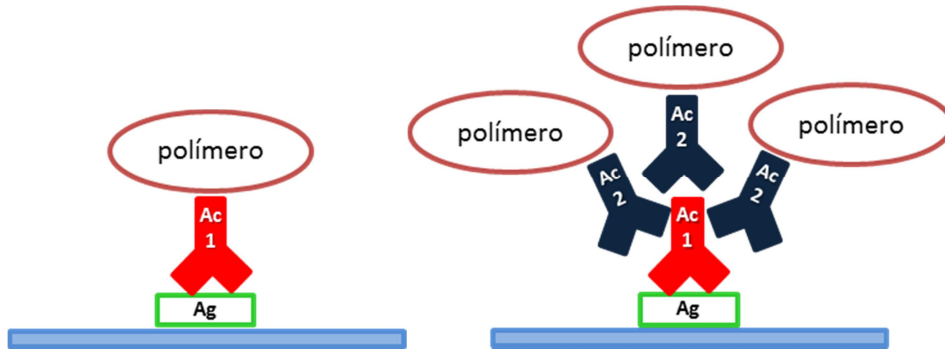


Figura 30 - A colocação do segundo anticorpo permite aumentar a quantidade de polímeros ligados. Além disso, este anticorpo permitirá prolongar em altura o anticorpo primário que está ligado ao tecido, facilitando assim a ligação ao polímero nas situações em que o antígeno se encontra na profundidade tridimensional do tecido - Figura 31.

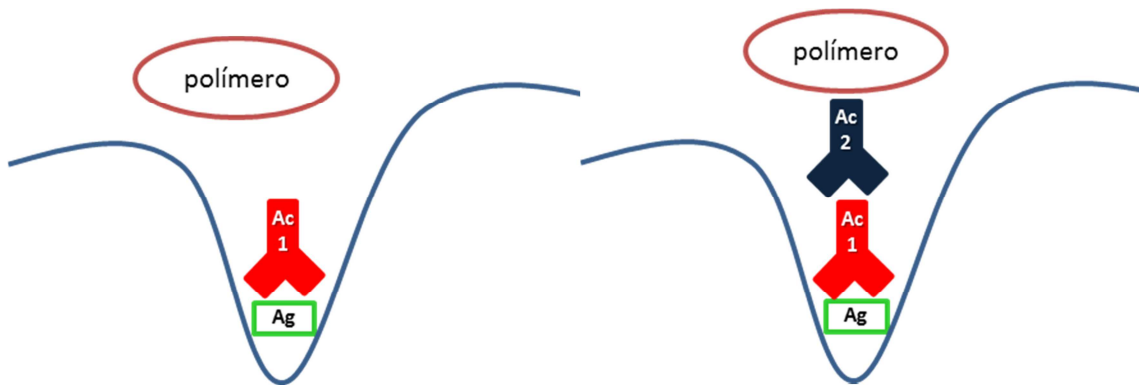


Figura 31 - A colocação do segundo anticorpo permite associar o polímero ao antígeno. Tendo em conta as suas características internas, os sistemas podem ser divididos em dois tipos: métodos de esqueleto interno e métodos de micropolímeros de enzimas.

2.11.4 Polímero de esqueleto interno

Como o próprio nome indica estas metodologias recorrem a uma macromolécula constituída por um esqueleto central, ao qual estão acopladas grandes quantidades de anticorpos e moléculas enzimáticas propiciadoras da visualização - Figura 32.

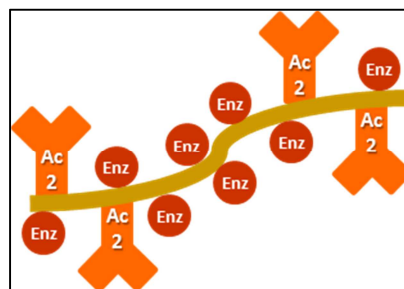


Figura 32 – Polímero de esqueleto interno

As principais moléculas utilizadas como esqueleto interno são os dextransos. Estes polissacarídeos hidrofílicos são caracterizados pelo seu elevado peso molecular de aproximadamente 500 kDa, alta hidrosolubilidade e baixa toxicidade/imunogenicidade. São bioquimicamente inertes, devido à sua rara ligação poli-(α -D-1,6-glucose) que os torna resistentes à clivagem pela glicosidases endógenas celulares⁽⁷⁶⁾ - Figura 33.

O dextrano é comercializado sob a forma de aglomerados poliméricos extremamente flexíveis, que em solução se transformam em espirais muito expansíveis. Este composto é facilmente solúvel em água e eletrólitos, constituindo soluções incolores, transparentes e altamente estáveis. O pH não afeta significativamente a sua solubilidade e é possível dissolvê-lo em sulfeto de metilo, formamida, etilenoglicol e glicerol. No entanto, é insolúvel em metanol, etanol, isopropanol, acetona e 2-propanona. As soluções de dextrano podem ser esterilizadas em autoclave e são estáveis por muitos anos, devendo ser conservadas a temperatura constante. O pH ideal para o armazenamento é entre 6.0 e 7.0, no entanto, o dextrano é estável à temperatura ambiente por longos períodos na faixa de pH 4-10. Em aplicação farmacêutica este composto é utilizado em várias preparações parentéricas, é um ingrediente de soluções para uso oftálmico e também é usado em cremes e pomadas⁽⁷⁶⁾.

Os dextransos são formados a partir da sacarose durante o crescimento de bactérias pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, todas pertencentes à família *Lactobacillaceae*. No entanto, a maioria dos dextransos é sintetizada pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*⁽⁷⁶⁾.

A biodegradação do dextrano é realizada por enzimas (dextranases) produzidas por alguns fungos como *Penicillium* e *Verticillium*. Os produtos de degradação são essencialmente açúcares de baixo peso molecular, por exemplo glicose ou isomaltose. Da mesma forma, muitas bactérias produzem dextranases extracelulares que degradam o dextrano em açúcares de baixo peso molecular: *Lactobacillus*, *Cellvibrio*, *Cytophaga* e *Bacillus spp*⁽⁷⁷⁾.



Figura 33 - Dextrano (esquerda - estrutura química; centro - aspecto físico; direita - *Leuconostoc mesenteroides*)

Fontes: <http://www.enterprise-europe-network.ec.europa.eu/src/request/pictures/Structure%20dextrane.gif>;

<http://www.dextran.net/dextrans-image-gallery.html>; <http://genome.jgi.doe.gov/leume/leume.home.html>

Este tipo de polímero atinge grandes dimensões e engloba cerca de 100 moléculas de HRP e até 20 anticorpos secundários do tipo cabra anti-ratinho ou cabra anti-coelho. Todas estas moléculas estão ligadas diretamente ao esqueleto de dextrano ativado⁽⁴⁷⁾.

Neste método aplica-se um anticorpo primário dirigido contra o antígeno pretendido e posteriormente aplica-se um polímero ao qual estão acoplados anticorpos “secundários” e substâncias propiciadoras da visualização – normalmente HRP - Figura 34.

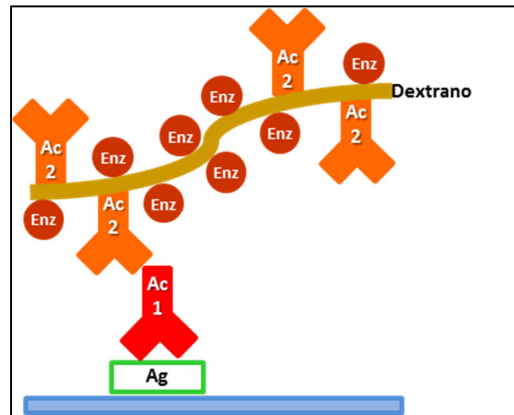


Figura 34 – Polímero de esqueleto interno indireto

No caso de o sistema possuir três passos será introduzido um segundo anticorpo entre o primário e o polímero - Figura 35.

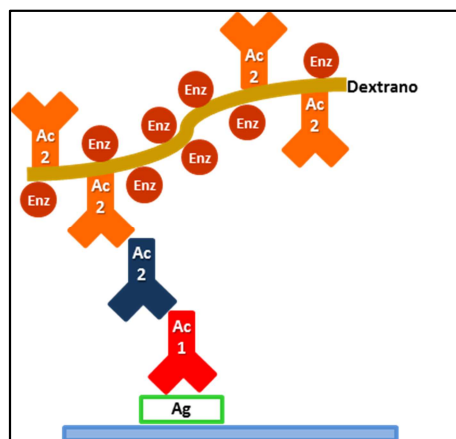


Figura 35 – Polímero de esqueleto interno com três passos

2.11.5 Micropolímeros de enzimas

A utilização dos polímeros aumenta drasticamente o número de enzimas que podem ser conjugadas com anticorpos. No entanto, no início da sua comercialização, esses produtos conjugados possuíam um tamanho muito elevado e a densidade de enzima por unidade de superfície não assumia a mesma proporção desse tamanho. Tendo em conta esta característica, conceptualizou-se que seria desejável obter um complexo anticorpo-enzima mais compacto, com um elevado número de moléculas de enzima ligado a cada anticorpo, mas garantindo um aumento mínimo de tamanho molecular⁽⁷⁸⁾.

De forma a alcançar este objetivo, fizeram-se algumas experiências que procuravam combinar pequenas moléculas de estrutura linear ou minimamente ramificada, de forma a polimerizar anticorpos e enzimas, constituindo um complexo muito compacto. Observou-se então que a polimerização de pequenas moléculas orgânicas monoméricas pode ser realizada com recurso ao ácido acrílico e ao

ácido bisacrílico. Assim, utilizaram-se estes reagentes de forma a criar um complexo de elevado nível de polimerização que não perde o seu poder de reação e penetrabilidade pois o rácio de polimerização, apesar de elevado, não se torna incomportável, pois é condicionado pelo facto da HRP apenas possuir um grupo amino que é facilmente acessível⁽⁷⁸⁾.

Ao contrário dos sistemas de polímero de esqueleto interno, que utilizam moléculas de dextrano com configuração molecular extensa, os micropolímeros de enzimas apostam no pequeno porte e na elevada concentração funcional. Embora o produto final desta conjugação por via do ácido acrílico e dos seus derivados, seja um complexo heterogéneo, com diferentes tamanhos moleculares, formas e rácios enzima/anticorpo, a experiência prática sugere que o conhecimento da relação exata entre anticorpo e enzima, da forma molecular ou do tamanho não é fundamental para avaliar o seu desempenho. Os resultados dos estudos indicam que a imunomarcagem proporcionada por estes reagentes é de elevada qualidade, independentemente dos antigénios serem de membrana, citoplasma ou núcleo⁽⁷⁸⁾.

Em resumo, pode-se afirmar que estes métodos se baseiam na polimerização de enzimas e sua associação a anticorpos, formando os micropolímeros de enzima - Figura 36.

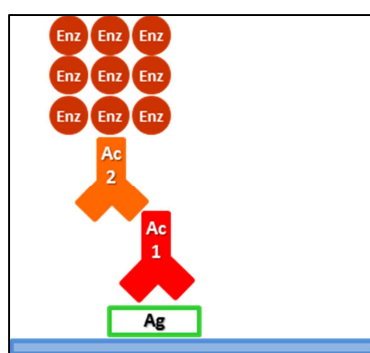


Figura 36 – Micropolímero de enzimas indireto

Tal como o anterior, também este sistema de polímero pode ser de três passos - Figura 37.

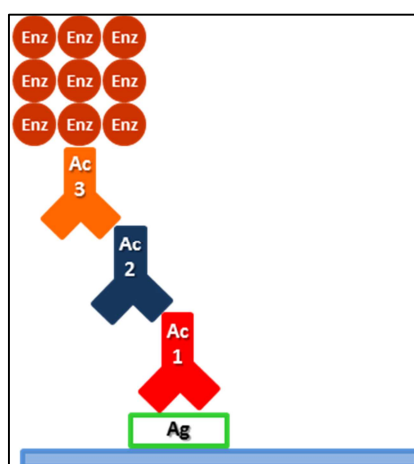


Figura 37 – Polímero de três passos

Segundo os seus fabricantes esta abordagem evita os problemas decorrentes do uso de dextrano ou de outras macromoléculas como esqueleto. O micropolímero com uma alta densidade de enzima muito ativa acoplada a um anticorpo secundário gera um reagente, que supera a interferência estérica, que advém do enorme volume ocupado pelo polímero de esqueleto interno. Este método proporciona maior acessibilidade ao antígeno pois a pequena dimensão dos seus reagentes permite uma melhor difusão aos pontos-alvo e uma redução da ligação não específica⁽⁷⁹⁾.

A metodologia estará sempre estreitamente ligada à tipologia investigacional eleita pelo investigador para corresponder aos seus objetivos investigacionais. Tendo o problema em mente, o pesquisador deve perguntar: "como e com que meios" poderei resolvê-lo? Na resposta identifica-se a metodologia, que corresponderá a um corpo orientador da pesquisa que, obedecendo a um sistema de normas, torna possíveis a seleção e articulação de técnicas, no intuito de se poder desenvolver o processo de verificação empírica ^{(29) (80)}.

3.1 Modelo conceptual adotado

À luz da literatura consultada foi assumido um modelo em que cada tipo de sistema de amplificação de polímero ao conseguir associar diferentes quantidades de molécula marcadora ao antigénio irá condicionar a qualidade final da técnica imunohistoquímica ^{(17) (18) (19) (20) (27) (81)}.

Também é pressuposto neste trabalho que a qualidade final da técnica imunohistoquímica, por sua vez, resulta da integração em forma de algoritmo de 4 fatores: intensidade de imunomarcção, proporção de imunomarcção específica, proporção de Imunomarcção inespecífica e contraste.

Por conseguinte, foi conceptualizado um modelo longitudinal de causa-efeito. Com base neste modelo teórico (Figura 38), foram escolhidos os instrumentos de recolha de dados, operacionalização das diferentes variáveis e a metodologia de análise de dados.



Figura 38 – Modelo conceptual do estudo

3.2 Metodologia do estudo

3.2.1 Desenho investigacional

Na fase conceptual deste trabalho foi estabelecido o objetivo proeminente que reside em contribuir para a evolução dos conhecimentos numa área com razoável base teórica e conceptual. Por esta mesma razão são apresentados objetivos investigacionais, em alternativa à enunciação de hipóteses de investigação.

Na fase metodológica foram definidos os instrumentos de recolha de dados e adequadas as metodologias de análise e classificação estatística.

Na fase empírica os casos histológicos positivos foram estudados diretamente mediante a aplicação de técnicas imunohistoquímicas para identificação de vários antigénios, com utilização dos diferentes sistemas de polímero (variável independente), avaliando-se posteriormente a qualidade final das imunomarcações realizadas (variável dependente) com recurso a uma observação estruturada com recurso a grelha de avaliação.

Na fase de interpretação e divulgação foram discutidos os resultados obtidos, apresentando resultados de estudos semelhantes e destacando semelhanças e divergências. Identificaram-se ainda limitações e sugestões para estudos futuros.

Com base em Fortin⁽⁸²⁾ foi estabelecido o desenho de investigação ilustrado na Figura 39.

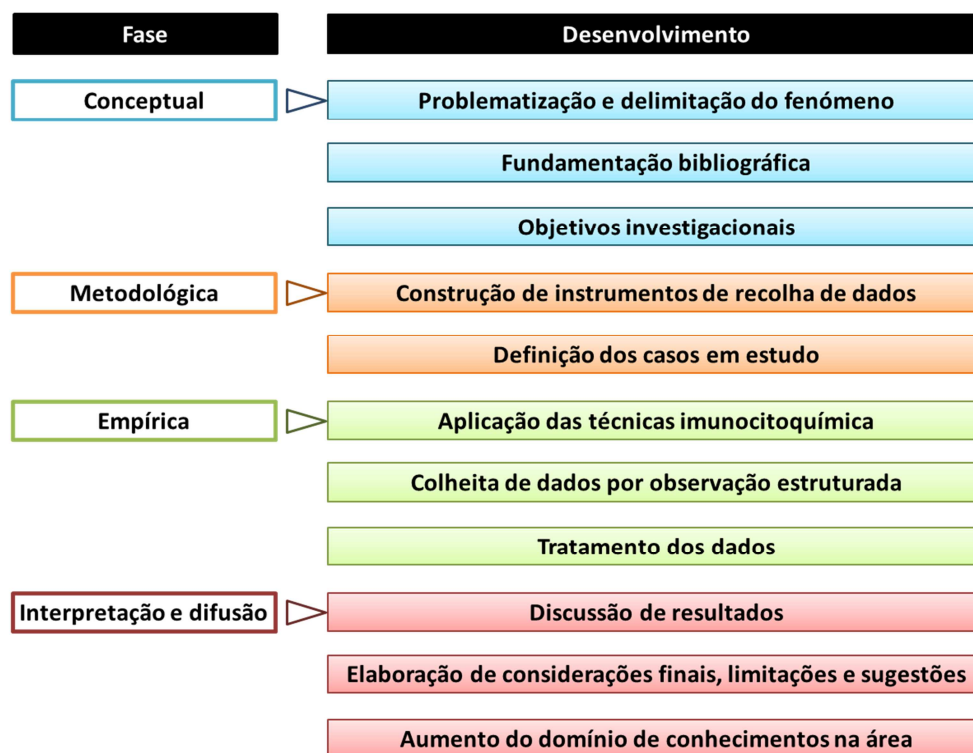


Figura 39 – Desenho de investigação

3.2.2 Classificação

A classificação das metodologias investigacionais utilizadas nos estudos tem sido, certamente, um dos processos mais difíceis e laboriosos dos que se deparam a um investigador na altura de escrever o seu trabalho científico. Lêem-se vários livros e artigos, discute-se com colegas e orientadores, consultam-se especialistas da área. Invariavelmente a conclusão é: existe uma quase universal impossibilidade de se conseguir enquadrar o tipo de estudo num só modelo. Se conseguimos emoldurar algumas características num determinado modelo, logo surgem outras que são inequivocamente atribuíveis a outro modelo e assim sucessivamente. A melhor saída para este dilema tem sido não restringir

o estudo a um único paradigma e descrever as suas características e enquadrá-las nos diferentes quadros ou modelos cientificamente aceitáveis.

Assim e analisando, de forma holística, as características deste estudo e respetivos objetivos, o método de investigação pode enquadrar-se nos referenciais do paradigma quantitativo segundo Fortin⁽⁸²⁾, pois existe um processo sistemático de colheita de dados observáveis e quantificáveis que se baseia na observação de factos objetivos, de acontecimentos e fenómenos que existem independentemente do investigador. Paralelamente este trabalho reflete um processo complexo que conduz a resultados que devem conter o menor enviesamento possível, procurando objetividade, predição e controlo.

No mesmo sentido, segundo Grawitz⁽⁸³⁾ e Pardal & Correia⁽⁸⁰⁾, esta investigação possui outras características que reforçam o seu enquadramento no paradigma quantitativo, uma vez que se baseia numa apresentação quantificada dos resultados, privilegiando o recurso a instrumentos e análise estatística.

Relativamente ao nível de conhecimentos, o estudo é classificado como sendo de nível IV (Base experimental) de acordo com a classificação de Fortin⁽⁸²⁾, porque visa a predição ou controlo de fenómenos. Segundo Pardal & Correia⁽⁸⁰⁾ trata-se também de um estudo experimental, pois é operacionalizado por controlo e manipulação de variáveis.

Finalmente pode-se ainda considerar, de acordo com Abramson⁽⁸⁴⁾, que este trabalho possui uma componente analítico-transversal, pois procura representar uma dada realidade, numa dada circunstância e recorrendo a um único momento de recolha de dados.

3.3 Fase conceptual

3.3.1 Recolha documental

No presente trabalho, a recolha documental permitiu uma vasta e cuidada contextualização teórica de temas e assuntos relacionados com as técnicas de amplificação, incidindo particularmente nos sistemas de polímeros. Contudo, a pesquisa alargou-se ainda às áreas mais generalistas das metodologias imunohistoquímicas e até da análise estatística. Foi, simultaneamente, realizada uma abrangente revisão de literatura relevante, por forma a sustentar teórica e conceptualmente toda a investigação.

3.3.2 Definição das variáveis

Uma variável consiste numa característica de pessoas, de objetos ou de situações estudadas numa investigação, a que se pode atribuir diversos valores⁽⁸²⁾.

As variáveis podem ser classificadas de várias formas, de acordo com o modo como são usadas numa investigação. Como tal existem diversos tipos de variáveis: variáveis independentes, variáveis dependentes, variáveis sociodemográficas (atributo) e variáveis estranhas⁽⁸²⁾.

As variáveis independentes são aquelas cujo efeito vai ser medido nas variáveis dependentes. Nesta investigação os sistemas de amplificação de polímero serão a variável independente.

Por sua vez, as variáveis dependentes são aquelas que são afetadas pela manipulação das variáveis independentes. Nesta investigação a qualidade final da imunomarcção decorrente das técnicas aplicadas será a variável dependente. Esta variável será construída por aplicação de um algoritmo às classificações da observação estruturada das lâminas imunohistoquímicas com recurso a grelha de avaliação.

As variáveis sociodemográficas, atributo ou organísmicas correspondem a características dos casos do estudo.

Por último, as variáveis estranhas são variáveis que podem ter efeitos inesperados e alterar os resultados de uma investigação. A presença deste tipo de variável deve ser evitada por todos os meios, pois pode influenciar quer as variáveis dependentes, quer as independentes⁽⁸²⁾.

3.3.2.1 Classificação estatística

Tendo em conta a nomenclatura estatística existem variáveis neste estudo que podem ser classificadas em⁽⁸⁵⁾:

- Variáveis qualitativas – referem-se a um atributo da unidade estatística, tal como género, cor, profissão, entre outros. Por sua vez pode ainda existir uma subclassificação deste tipo de variáveis consoante os seus elementos sejam hierarquizáveis (escala ordinal) ou não (escala nominal).
- Variáveis quantitativas – referem-se a elementos mensuráveis, tal como peso, altura ou idade. Podem ser contínuas – assumem um número infinito de valores dentro de um determinado intervalo – ou discretas - assumem um número finito de valores dentro de um determinado intervalo.

Aplicando esta classificação verifica-se que a variável *sistemas de amplificação de polímero* é uma variável qualitativa medida em escala nominal. A variável *qualidade final da imunomarcção* é uma variável quantitativa discreta. Por sua vez as variáveis que resultam diretamente da aplicação do instrumento de recolha de dados (intensidade; imunomarcção específica; imunomarcção não específica; intensidade da coloração de contraste) são variáveis qualitativas medidas em escala ordinal.

3.3.3 Autorizações institucionais

Foi consultada a Direção da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL), na pessoa do seu Diretor, Prof. Manuel Correia, que, amavelmente, autorizou que se realizasse o projeto nessa Instituição.

3.4 Fase metodológica

Os sistemas de amplificação utilizados foram:

- EnVision+ System, HRP (DakoCytomation. Ref:K4007);
- ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit (Vector Laboratories, Inc. Ref: MP-7402);
- UltraVision LP (LABVision. Ref: TL-015-HD);
- NovoLink Polymer Detection System (Novocastra TM. Ref: RE7140-CE).

Para permitir uma verdadeira comparação de sistemas de amplificação, optou-se por utilizar a totalidade de reagentes fornecidos nas embalagens comerciais, apesar destas não incluírem exatamente os mesmos reagentes - Tabela 6.

EnVision+	ImmPRESS	UltraVision	NovoLink
Bloqueio Peroxidase Endógena		Bloqueio Peroxidase Endógena	Bloqueio Peroxidase Endógena
	Bloqueio Proteico	Bloqueio Proteico	Bloqueio Proteico
		Ativador	Ativador
Polímero	Polímero	Polímero	Polímero
DAB		DAB	DAB
			Hematoxilina

Tabela 6 - Reagentes disponibilizados por cada sistema

3.4.1 EnVision+ System, HRP

O polímero EnVision+ é um sistema de dois passos baseado num esqueleto interno de dextrano fornecido de anticorpos secundários e marcado com HRP. Todos os reagentes deste sistema, excluindo o cromogéneo líquido DAB + substrato, são prontos a usar. Este sistema é extremamente sensível e, como resultado, permite diluições ótimas do anticorpo primário até 20 vezes superiores aos obtidos por técnicas não poliméricas. O EnVision+ permite um sinal reforçado na deteção de antigénios presentes em baixas concentrações ou para baixas concentração de anticorpos primários⁽⁸⁶⁾ - Figura 40 - Anexo 1.



Figura 40 – Embalagem do sistema EnVision+

Fonte: http://www.dako.com/dist/dako_corporateimages_products_flexreagents.jpg

3.4.2 ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit

O sistema ImmPRESS é um sistema de dois passos baseado no método de polimerização de enzimas e sua conjugação com anticorpos. Esta abordagem evita as deficiências intrínsecas da utilização de dextrans de grande dimensão ou outras macromoléculas como esqueleto interno. Anexar um micropolímero único com uma alta densidade de enzima muito ativa a um anticorpo secundário, gera um reagente que supera a interferência estérica e consegue acesso ao seu alvo. O resultado é excelente sensibilidade e intensidade de sinal. A eliminação de um grande esqueleto interno permite uma melhor difusão dos reagentes para os pontos de destino e uma redução na ligação não específica. Os reagentes do ImmPRESS são fornecidos em formato pré-diluído, o que, juntamente com menos etapas no processo de imunomarcção, permite economizar tempo, sem sacrificar a intensidade nem comprometendo a da qualidade de fundo⁽²³⁾ - Figura 41 - Anexo 2



Figura 41 – Embalagem do sistema ImmPRESS

Fonte: <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=436>

3.4.3 UltraVision LP

O UltraVision LP é um sistema de três passos baseado na mais recente tecnologia de micropolímeros. Esta segunda geração é composta por subunidades menores de polímero que minimizam os conflitos de ligação à proteína alvo aumentando a intensidade da imunomarcção. Este sistema de detecção reconhece imunoglobulinas de ratinho ou coelho ligadas aos antígenos nos cortes histológicos⁽²⁵⁾ - Figura 42 - Anexo 3.



Figura 42 – Embalagem do sistema UltraVision LP

Fonte: <http://www.medssofia.com/inmunohistoquimica.html>

3.4.4 NovoLink Polymer Detection System

O sistema de três passos NovoLink utiliza uma tecnologia nova de polimerização que permite a preparação de conjugados de anticorpos e HRP. Estes produtos são utilizados num procedimento imunohistoquímico que permite a identificação qualitativa de antígenos, por microscopia ótica, em cor-

tes de tecido fixado com formalina e incluído em parafina. O *NovoLink Polymer* reconhece imunoglobulinas de ratinho e coelho.

Para além do polímero propriamente dito, este sistema é comercializado com diversos reagentes complementares: *Peroxidase Block*, *Protein Block*, *Post Primary Block*, substrato/cromogénio (DAB) e ainda *Novocastra Hematoxylin*⁽²⁴⁾ - Figura 43 - Anexo 4.



Figura 43 – Embalagem do sistema NovoLink

Fonte: <http://www.leica-microsystems.com/news-media/news/news-details/article/bringing-high-quality-ihc-to-13-billion-people/>

3.4.5 Conceptualização do instrumento de recolha de dados

Se num estudo científico for usado um procedimento de recolha de dados não reprodutível, ao repetir o mesmo estudo, nas mesmas circunstâncias podem-se obter diferentes resultados e conclusões. É fundamental ter garantias de reprodutibilidade, por um lado, optando pelo envolvimento de observadores experientes, que podem aumentar a consistência dos dados, especialmente na concordância inter-observador, e, por outro lado, utilizando um instrumento que normalize a recolha de dados, pois a falta de normas simples e objetivas podem também ser uma causa da falta de reprodutibilidade de um procedimento⁽⁸⁷⁾.

Apesar de já existirem alguns programas informáticos que permitem avaliar a qualidade da imunomarcção por análise de imagem, o seu preço elevado e a sua irregular sensibilidade e reprodutibilidade implicam uma baixa implantação, pelo que a quantificação automatizada da marcação imunohistoquímica ainda constitui um problema de standardização por resolver, não sendo aplicada neste estudo^{(88) (89)}.

Segundo Barnes e seus colaboradores, na avaliação da qualidade dos resultados da técnica imunohistoquímica é importante que, entre os métodos rigorosamente construídos, se selecione um que seja “easy, quick and reproducible”⁽⁹⁰⁾, enquanto para o *International Concensus Group on Standardization and Quality Control in Immunohistochemistry* importa que exista uma garantia de validação relativamente a interpretação uniforme do método imunohistoquímico^{(91) (92)}.

Estas diretrizes fundamentaram a escolha do método de avaliação da imunomarcção utilizado neste trabalho, tendo-se optado por uma metodologia simples, objetiva e operacionalizada baseada em Leake⁽⁹³⁾ e defendida por vários grupos de trabalho, nomeadamente o *UK Receptor Group*, o *UK National External Quality Assessment Scheme for Immunocytochemistry*, o *Scottish Breast Cancer Pathology Group* e o *Receptor and Biomarker Study Group of the European Organization for Research and*

Treatment of Cancer. Trata-se de um método de avaliação que surge na continuidade dos estudos de Allred e colaboradores⁽⁹¹⁾ e Harvey e colaboradores⁽⁹⁴⁾, sendo caracterizado por oferecer elevada consistência na reprodutibilidade intra e inter-observadores - Figura 44.



Figura 44 – Conceptualização da metodologia de recolha de dados

Com base nesta conceptualização e de forma a permitir a interpretação e avaliação da imunomarcção, torna-se importante possuir uma escala de avaliação que quantifique os parâmetros sensibilidade e especificidade.

3.4.5.1 Sensibilidade

A sensibilidade é definida como a capacidade de reconhecer os verdadeiros positivos⁽⁹⁵⁾. Partindo deste princípio poderemos operacionalizar este parâmetro analisando e classificando a intensidade da marcação específica e a quantidade relativa de estruturas marcadas especificamente.

Assim, quanto mais forte for a intensidade e quanto maior for a quantidade de estruturas marcadas relativamente às estruturas elegíveis (verdadeiros positivos) tanto melhor é a qualidade da imunomarcção.

3.4.5.2 Especificidade

Genericamente pode-se afirmar que a especificidade é a capacidade de reconhecer os verdadeiros negativos⁽⁹⁵⁾. Partindo deste princípio pode-se inferir, em oposição, que a inespecificidade é a capacidade de um anticorpo estabelecer ligações com estruturas que não estiveram na sua génese. Aplicando estes conceitos à imunomarcção pode-se caracterizar como inespecífica a presença de marcação em estruturas que não deveriam estar marcadas, uma vez que o anticorpo não é dirigido contra elas.

Assim, quanto maior for a quantidade de estruturas marcadas relativamente às estruturas “ não elegíveis” (verdadeiros negativos) tanto pior é a qualidade da imunomarcção.

A marcação inespecífica pode surgir por diversos motivos, como por exemplo reações cruzadas entre anticorpos ou baixa afinidade entre anticorpo e antigénio. Comumente é feita a distinção entre marcação inespecífica propriamente dita e marcação de fundo. A principal diferença entre estas duas é dada pela forma de apresentação: enquanto a marcação inespecífica propriamente dita é eletiva para as estruturas intra ou extra-celulares marcando-as de forma semelhante à marcação específica, a marcação de fundo não é eletiva dispersando-se de forma irregular pelas estruturas celulares. No entanto, para efeitos desta escala de avaliação não foi considerada relevante esta distinção pois uma marcação imunohistoquímica é de baixa qualidade quando apresenta marcação inespecífica, independentemente do seu subtipo.

3.4.5.3 Contraste

Finalmente, foi também avaliado o contraste utilizado, tendo em conta que a sua qualidade pode incrementar ou diminuir a intensidade e eletividade da imunomarkação, tendo algum impacto na sua qualidade final.

3.4.6 Construção do instrumento de recolha de dados

Quantificou-se a qualidade da marcação imunohistoquímica constituindo como metodologia de recolha de dados a observação microscópica com recurso a uma grelha de avaliação que permite atribuir uma pontuação aos parâmetros: intensidade de imunomarkação, imunomarkação específica, Imunomarkação não específica e intensidade da coloração de contraste - Figura 45.



Figura 45 – Operacionalização da metodologia de recolha de dados

3.4.6.1 Intensidade de imunomarkação

A intensidade de marcação permite apreciar a capacidade amplificativa dos métodos de amplificação utilizados. Este item obterá expressão prática submetendo-o a hierarquização numa escala ordinal que se inicia em *marcação nula* que corresponde à pior situação possível e terminando em *marcação muito forte intensidade* que corresponde à melhor situação possível.

Após a visualização ao microscópio da totalidade do tecido em estudo é classificada a intensidade de marcação de acordo com uma escala de cinco níveis associados aos valores 0 a 4 - Tabela 7.

Valor	Características	Operacionalização
0	Marcação nula	---
1	Marcação de fraca intensidade	Visível somente em muito grande ampliação – 400x
2	Marcação de moderada intensidade	Visível somente em grande ampliação – 100x
3	Marcação de forte intensidade	Visível em baixa ampliação - 40x
4	Marcação de muito forte intensidade	Nitidamente visível em baixa ampliação – 40x

Tabela 7 - Classificação da intensidade de imunomarcação

3.4.6.2 Proporção de imunomarcação específica

A proporção de imunomarcação específica permite examinar o rácio entre estruturas "marc veis" e estruturas marcadas. Este item obter  expressão prática submetendo-o a hierarquização numa escala ordinal que se inicia em *0% de marcação do alvo* que corresponde à pior situação possível e terminando em *marcação em 67 a 100% do alvo* que corresponde   melhor situação possível. Após a visualização ao microscópio da totalidade do tecido em estudo é classificada a proporção de estruturas verdadeiras-positivas de acordo com uma escala de quatro níveis associados aos valores 0 a 3 - Tabela 8.

Valor	Características	Operacionalização
0	0% de marcação do alvo	---
1	Marcação de 1 a 33% do alvo	Estimativa de marcação de 1 em 3 estruturas alvo
2	Marcação em 34 a 66% do alvo	Estimativa de marcação de 2 em 3 estruturas alvo
3	Marcação em 67 a 100% do alvo	Estimativa de marcação de 3 em 3 estruturas alvo

Tabela 8 - Classificação da imunomarcação específica

3.4.6.3 Proporção de imunomarcação inespecífica

A proporção de imunomarcação inespecífica permite examinar o rácio entre estruturas "não marc veis" e estruturas marcadas. Este item obter  expressão prática submetendo-o a hierarquização numa escala ordinal que se inicia em *Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo* que corresponde à pior situação possível e terminando em *Ausência de marcação de estruturas não-alvo* que corresponde   melhor situação possível.

Após visualização microscópica da totalidade do tecido em estudo, é classificada a proporção de estruturas falsas-positivas de acordo com uma escala de quatro níveis associados aos valores 0 a 3 - Tabela 9.

Valor	Características	Operacionalização
0	Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo	Estimativa de marcação de 3 em 3 estruturas não-alvo
1	Marcação em 34 a 66% de estruturas não-alvo	Estimativa de marcação de 2 em 3 estruturas não-alvo
2	Marcação de 1 a 33% de estruturas não-alvo	Estimativa de marcação de 1 em 3 estruturas não-alvo
3	Ausência de marcação de estruturas não-alvo	---

Tabela 9 - Classificação da imunomarcação inespecífica

3.4.6.4 Intensidade de coloração de contraste

A intensidade de coloração de contraste possibilita a apreciação da qualidade do contraste utilizado. Este item obter  expressão prática submetendo-o a hierarquização numa escala ordinal que se inicia em *ausência de coloração* que corresponde à pior situação possível e terminando em *coloração de muito forte intensidade* que corresponde   melhor situação possível.

Após a visualização ao microscópio da totalidade do tecido em estudo é classificada a intensidade da coloração de contraste de acordo com uma escala de cinco níveis associados aos valores 0 a 4 - Tabela 10.

Valor	Características	Operacionalização
0	Ausência de coloração	---
1	Coloração de fraca intensidade	Visível somente em muito grande ampliação – 400x
2	Coloração de moderada intensidade	Visível somente em grande ampliação – 100x
3	Coloração de forte intensidade	Visível em baixa ampliação - 40x
4	Coloração de muito forte intensidade	Nitidamente visível em baixa ampliação – 40x

Tabela 10 - Classificação da intensidade de coloração de contraste

3.4.6.5 Score final

Para permitir uma constatação mais imediata e perceptível da qualidade da imunohistoquímica, uma comparabilidade entre estudos e um tratamento estatístico mais aprofundado, foi criado o Score Global de qualidade da imunohistoquímica. Este dado quantitativo resulta da aplicação de um algoritmo sobre os itens referidos anteriormente.

Numa tentativa de valorizar os itens que mais contribuem para a qualidade final da marcação imunohistoquímica foram introduzidos fatores de ponderação. O item considerado mais relevante foi “intensidade de imunomarcação” pelo que lhe foi atribuído o fator de ponderação 3. Em seguida foi considerado o item “imunomarcação específica” com o fator de ponderação 2. Finalmente surgem os parâmetros “imunomarcação não específica” e “intensidade da coloração de contraste” com o fator de ponderação 1 - Figura 46.

$$\begin{array}{|c|} \hline \text{parâmetro} \\ \hline \text{intensidade de} \\ \text{imunomarcação} \\ \hline \end{array} \times \begin{array}{|c|} \hline \text{FP} \\ \hline 3 \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline \text{parâmetro} \\ \hline \text{Imunomarcação} \\ \text{específica} \\ \hline \end{array} \times \begin{array}{|c|} \hline \text{FP} \\ \hline 2 \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline \text{parâmetro} \\ \hline \text{Imunomarcação} \\ \text{inespecífica} \\ \hline \end{array} \times \begin{array}{|c|} \hline \text{FP} \\ \hline 1 \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline \text{parâmetro} \\ \hline \text{contraste} \\ \hline \end{array} \times \begin{array}{|c|} \hline \text{FP} \\ \hline 1 \\ \hline \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline \text{Score Final} \\ \hline \end{array}$$

Figura 46 – Algoritmo para obtenção do Score Global

Desta forma procura-se garantir que ao maior score equivale a melhor qualidade de marcação imunohistoquímica. O Score Global (SG) pode tomar valores entre 0 (pior resultado possível, em que não há intensidade de marcação imunohistoquímica, não há marcação específica, não há contraste, havendo somente forte marcação inespecífica) e 25 (melhor resultado possível, implicando uma lâmina com todas as células marcadas especificamente com muita intensidade, um contraste também muito intenso e sem marcação inespecífica).

Após o esboço da primeira versão da grelha de avaliação da qualidade da imunomarcação foi feito um pré-teste, permitindo uma validação interna da eficácia e pertinência do mesmo.

3.4.7 Pré-teste do instrumento de recolha de dados

Depois de ultimado o instrumento, contactaram-se três profissionais com experiência na área de imunohistoquímica que acederam a aplicar e criticar o instrumento de recolha de dados. Foram selecionados por possuírem funções profissionais que lhes permitiam contextualizar-se no instrumento e criticá-lo de forma sustentada. Estes elementos que pertencem ao grupo de pré-teste não foram

posteriormente integrados no grupo de peritos avaliadores da qualidade da imunomarcção, tal como preconizado por Fortin ⁽⁸²⁾. Foi avaliada a estrutura e a linguagem específica, tendo o grupo de pré-teste sugerido pequenas alterações que foram introduzidas oportunamente, tendo-se assim preparado a versão final do instrumento de recolha de dados- Apêndice 4.

3.5 Fase empírica

3.5.1 Pedidos às firmas comerciais

Foram contactadas as firmas Baptista Marques Diagnóstica e Reagentes Lda., Inopat, Labometer - sociedade técnica de equipamentos de laboratório e Menarini Diagnósticos Portugal, que, gentilmente, cederam os seus sistemas de amplificação para o estudo.

3.5.2 Tecidos histológicos

Utilizaram-se tecidos humanos (pulmão, fígado e apêndice ileocecal, entre outros) que se sabia serem positivos para cada um dos anticorpos utilizados - Tabela 11.

Órgão/Tecido	Características histológicas
Pulmão	Células musculares lisas; células endoteliais dos capilares; pneumócitos tipo I e II; macrófagos; epitélio pavimentoso simples
Fígado	Células do estroma (fibroblastos, monócitos, macrófagos), células hepáticas (hepatócitos, células de Kupfer, células biliares); veia centrolobular, espaços porta; trabéculas de hepatócitos delimitadas por sinusóides, epitélio simples, rede de reticulina.
Apêndice ileocecal	Epitélio glandular com vacúolos, lúmen com detritos, folículos germinativos com linfócitos B no centro e linfócitos T na periferia, vasos com hemorragia, tecido adiposo, faixa muscular longitudinal e circular, terminais nervosos.

Tabela 11 – Características histológicas de alguns dos órgãos utilizados ⁽⁹⁶⁾

Os tecidos tinham sido previamente fixados em formol tamponado a 10% e, após processamento histológico, incluídos em blocos de parafina. Para evitar enviesamentos provocados por variações pré-analíticas (fixação e processamento dos tecidos), utilizaram-se cortes seriados do mesmo bloco de parafina para cada um dos ensaios. Este procedimento assegura que as variações de qualidade final da imunomarcção encontradas estão relacionadas com diferenças entre os sistemas de amplificação utilizados, e não com outros fatores, evitando a intervenção de variáveis estranhas.

Com base nos diferentes blocos, obteve-se, com recurso a micrótopo rotativo Leica RM2235, um total de 120 cortes histológicos de 3 µm. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro previamente adesivadas por histobond® (Marienfeld ref. 0810000) e permaneceram 60 minutos em estufa a 60° Celsius para promover a aderência - Figura 47. Estes casos foram utilizados para efetuar as marcações imunohistoquímicas com os quatro sistemas de amplificação em estudo (30 lâminas para cada sistema).



Figura 47 – Esquerda - micrótopo rotativo; Centro – lâminas adesivadas; Direita - estufa de secagem

3.5.3 Soros primários

Foram utilizados 15 soros primários monoclonais, incluindo anti-CD8, anti-vimentina e anti-desmina, entre outros - Tabela 12. Estes soros foram selecionados de forma a constituir um painel diversificado que permitisse a marcação de vários alvos com localizações celulares diferentes (membrana, citoplasma ou núcleo).

Foi utilizada, para cada um dos soros, uma diluição de trabalho que implicou a duplicação das diluições em uso no laboratório de imunohistoquímica da ESTeSL, de forma a criar-se uma situação de exigência que revelasse as verdadeiras capacidades amplificativas dos sistemas utilizados. Como exemplo deste procedimento temos o soro anti-desmina cuja diluição de trabalho aferida para aplicação de rotina era de 1/100 e que neste estudo foi utilizado a 1/200 (2x100).

Soro anti-	Clone	Marca	DPL ¹	DUE ²	Marcação	Descrição em
Cadeias leves Kappa	KP-53	Novocastra TM	1:1000	1:2000	Citoplasma	Anexo 5
Cadeias leves Lambda	HP-6054	Novocastra TM	1:100	1:200	Citoplasma	Anexo 6
Caldesmon	h-CD	DakoCytomation	1:500	1:1000	Citoplasma	Anexo 7
CD 105	SN6h	DakoCytomation	1:10	1:20	Membrana	Anexo 8
CD 45 RA	X148	Novocastra TM	1:80	1:160	Citoplasma	Anexo 9
CD 79a	11D10	Novocastra TM	1:100	1:200	Membrana	Anexo 10
CD 8	4B11	Novocastra TM	1:40	1:80	Membrana	Anexo 11
CEA	12-140-10	Novocastra TM	1:200	1:400	Citoplasma	Anexo 12
CK 7	OV-TL 12/30	Novocastra TM	1:50	1:100	Citoplasma	Anexo 13
CK 8/18	5D3	Novocastra TM	1:100	1:200	Citoplasma	Anexo 14
Desmina	DER11	Novocastra TM	1:100	1:200	Citoplasma	Anexo 15
Ki 67	MM1	Novocastra TM	1:200	1:400	Núcleo	Anexo 16
Recetores de Progesterona	1A6	Novocastra TM	1:200	1:400	Núcleo	Anexo 17
Vimentina	V9	Novocastra TM	1:100	1:200	Citoplasma	Anexo 18
αFP	C3	Novocastra TM	1:50	1:100	Citoplasma	Anexo 19

Tabela 12 – Características dos soros utilizados

3.5.4 Técnica imunohistoquímica

Seguindo as indicações dos fabricantes (Tabela 13), foi utilizada técnica manual que se iniciou com a **desparafinação** dos tecidos em xileno durante 10 minutos e hidratação em concentrações decrescentes de etanol.

A recuperação antigénica foi realizada em forno de micro-ondas doméstico, recorrendo a um ciclo de 15 minutos a 700w. Utilizou-se a solução de EDTA 1mM (pH 8.0) como tampão de recuperação - Apêndice 1.

De seguida procedeu-se ao **bloqueio da peroxidase endógena** com o reagente de bloqueio de cada um dos sistemas durante 5 minutos - exceto no ImmPRESS onde optou por utilizar o bloqueio do sistema EnVision+ uma vez que este sistema não inclui o reagente.

Também foi realizado o **bloqueio proteico** de acordo com os reagentes presentes no ImmPRESS, NovoLink e UltraVision. Não foi efetuado este passo no Envision+, uma vez que não é recomendado pelo fabricante.

¹ DILUIÇÃO PRÉVIA DO LABORATÓRIO

² DILUIÇÃO UTILIZADA NO ESTUDO

Aplicou-se então o **soro primário**, utilizando as diluições de trabalho já referidas, durante 30 minutos - Figura 48.



Figura 48 – Preparação da incubação do soro primário

Posteriormente foi incubado o **ativador**. Os Sistemas NovoLink e UltraVision incluem uma solução com esta denominação que é aplicada durante 30 minutos e 20 minutos, respetivamente.

Seguiu-se o **polímero**, que incubou durante 30 minutos.

Após este passo foi colocado o **cromogénio** 3'3-DAB de cada um dos sistemas durante 5 minutos – exceto no ImmPRESS em que, para garantir maior homogeneidade, se optou por utilizar o 3'3-DAB da mesma marca (Vector SK4100), , adquirido à parte uma vez que este sistema não inclui o reagente - Anexo 20.

Finalmente, aplicou-se o **contraste**, utilizando-se hematoxilina de Mayer para todos os testes, exceto para o NovoLink, que possui a sua própria hematoxilina.

Desidratou-se os tecidos e procedeu-se à montagem em meio sintético Entellan (Merck ref. 1079600500).

Todas as lavagens entre incubações foram realizadas com PBS (Biocrohm ref. L 182-01) com Tween 20 a 0,05% (Sigma-Aldrich ref. P1379).

EnVision+	ImmPRESS	UltraVision	NovoLink
Desparafinar			
Recuperação Antigénica (EDTA pH 8.0)			
Bloqueio Peroxidase Endógena			
		Bloqueio Proteico	
Soro Primário			
		Ativador	
Polímero			
Cromogénio (3'3-DAB)			
Contraste - Hematoxilina			

Tabela 13 - Protocolo utilizado

3.5.5 Controlo de qualidade

Para mitigar a variabilidade que podia decorrer da realização de vários *runs* de imunohistoquímica optou-se por realizar 2 *runs*, cada um com 60 casos (15 soros primários x 4 polímeros), que decorreram em 2 dias seguidos.

Cada sequência de imunomarcção incluiu controlos positivos para confirmar um desempenho adequado de todos os reagentes aplicados. Caso o controlo positivo não tivesse demonstrado uma marcação positiva apropriada, teriam sido consideradas inválidas as imunomarcções das amostras em teste.

3.5.6 Avaliação da qualidade da imunomarcção

As lâminas dos casos em estudo foram observadas ao microscópio ótico por dois avaliadores com experiência na visualização e avaliação de técnicas deste tipo.

A visualização foi independente e realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo método de avaliação da imunomarcção descrito. Também foi observada a lâmina do controlo externo positivo para apreciação da qualidade dos resultados.

3.5.7 Tratamento dos dados

O tratamento dos dados consiste na aplicação de um conjunto de métodos estatísticos que permitem visualizar, classificar, descrever e interpretar os dados colhidos⁽⁸²⁾.

A informação recolhida com base na grelha de avaliação da imunomarcção foi distribuída por base de dados em programa informático SPSS® for Windows, versão 11.0. Numa fase subsequente a base de dados foi analisada e testaram-se as associações e correlações existentes com recurso aos testes estatísticos adequados.

O estudo estatístico foi realizado com recurso a diversas formas de apresentação e análise estatística, sempre selecionadas de acordo com os objetivos do estudo, com o modelo conceptual e com o tipo de medida e escala utilizadas. Foram empregues^{(82) (85) (97)}:

- Distribuições de frequência simples ou relativas, ou seja, simplesmente a apresentação do número de vezes que ocorrem as variáveis;
- Medidas de tendência central, isto é, medidas que apresentam os valores típicos da distribuição (exemplo: média, mediana e moda);
- Medidas de dispersão, que representam a quantidade de variação que a distribuição evidencia (exemplo: desvio-padrão);
- Medidas de apresentação da forma da distribuição, de que são exemplos habituais a assimetria/enviesamento e a curtose/achatamento. A assimetria mede o enviesamento das caudas da distribuição. As distribuições simétricas (normais) têm assimetria de valor zero. Se assimetria <0, então a distribuição tem um enviesamento à direita (valores acima da média mais

condensados). Se assimetria > 0 , então a distribuição tem um enviesamento à esquerda (valores abaixo da média mais condensados). A curtose mede o achatamento da forma da distribuição. As distribuições normais têm curtose de valor zero. Se curtose > 0 , então a distribuição é menos achatada (lepticúrtica). Se curtose < 0 , então a distribuição é mais achatada (platicúrtica).

Sempre que pareceu útil recorreu-se à representação gráfica dos dados, sendo utilizados:

- Gráficos de barras simples ou compostos, permitindo a apresentação de dados de frequências absolutas ou relativas.
- Histogramas com curva normal sobreposta, que facultam a visualização do tipo de forma da distribuição e avaliação gráfica dos valores de cut-off e sua relevância.
- Diagramas de extremos e quartis ou, mais vulgarmente, caixas de bigodes, que facilitam a informação relativamente à forma e dispersão da distribuição, para além de evidenciar objetivamente os extremos (outliers) existentes.

Os testes estatísticos a utilizar neste trabalho foram selecionados de acordo com os objetivos do estudo, com o modelo conceptual e com o tipo de medida e escala utilizadas. Foram utilizados maioritariamente testes paramétricos apesar de por vezes as variáveis não seguirem uma distribuição normal, mas tendo em conta o n em estudo de 240 unidades de análise ou observações (120 casos x 2 observadores) - Tabela 14 - é possível fundamentar esta opção com o teorema do limite central que nos diz que dada uma população com variáveis que não têm uma distribuição normal com média μ e variância δ^2 , para amostras com dimensão suficientemente grande ($n \geq 30$), a distribuição das médias amostrais \bar{X} será aproximadamente normal, com média μ e variância $\delta^2/2$ ⁽⁹⁷⁾.

O valor de significância estatística utilizado foi de alfa=0,05, sendo este o valor mais usual neste tipo de estudos, com base experimental ⁽⁹⁷⁾.

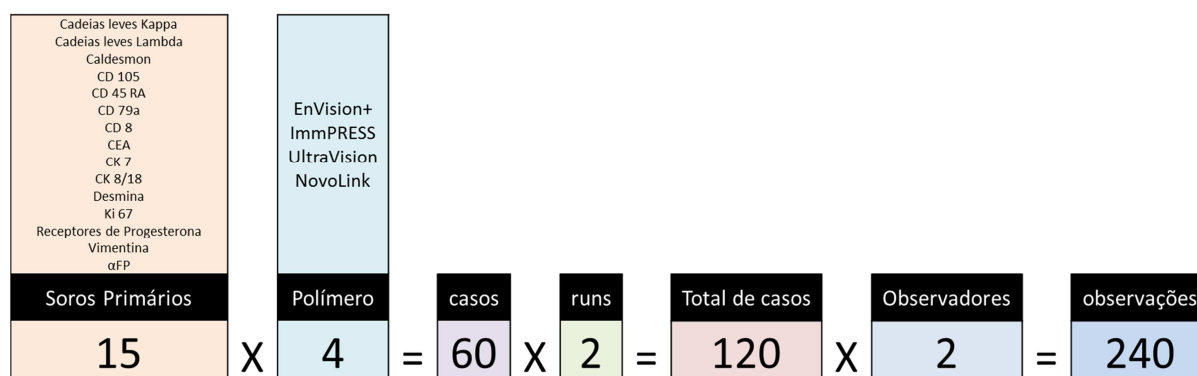


Tabela 14 - obtenção das unidades de análise

3.5.7.1 Teste de Kolmogorov-Smirnov

Foi utilizado este teste com correção de Lilliefors, por forma avaliar a normalidade da distribuição das variáveis apresentadas em escala quantitativa. A distribuição pode ser considerada normal caso a estatística seja não significativa^{(97) (98)}.

3.5.7.2 OneWay ANOVA

O objetivo principal da análise de variância (*analysis of variance* - ANOVA) é comparação de mais do que dois grupos no que diz respeito à localização. Esta comparação é feita a partir da análise da dispersão presente no conjunto de dados, daí a designação de análise de variância.

Este teste, sendo uma extensão do teste *t*, compara as médias de mais de dois grupos de casos. É utilizado quando se quer analisar se existe diferença significativa para uma variável, em escala quantitativa, em função de outra variável que pode ter *n* grupos^{(85) (99)}.

Para uma análise mais profunda dos dados recorreu-se ao teste *post-hoc* de Tukey que permite complementar a informação do teste OneWay ANOVA discriminando os resultados por grupo da variável independente.

3.5.7.3 Variabilidade inter-observador

A variabilidade inter-observador é um fenómeno estudado em Anatomia Patológica⁽¹⁰⁰⁾, podendo ser caracterizada por 3 indicadores estatísticos: a Correlação (ρ) de Pearson, o Coeficiente de Correlação Intraclasse e o Alfa de Cronbach.

3.5.7.3.1 Correlação de Pearson

Este teste é aplicável quando duas variáveis são medidas por uma escala quantitativa e a relação entre as variáveis é linear. O seu valor (ρ de Pearson) distribui-se entre [-1, +1] sabendo-se que o limite inferior implica uma correlação negativa enquanto o limite superior implica uma correlação positiva⁽⁸⁵⁾. Neste trabalho decidiu-se considerar as correlações como fortes no caso de o teste apresentar valores significativos inferiores a -0.8 ou superiores a 0.8. Os restantes valores foram considerados não relevantes.

3.5.7.3.2 Coeficiente de Correlação Intraclasse

Este Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC) é usado para medir a concordância inter-observador para dois ou mais avaliadores. Também pode ser usado para avaliar confiabilidade teste-reteste. O ICC pode ser conceptualizado como a relação entre a variância dos grupos e a variância total⁽¹⁰¹⁾. Este valor distribui-se entre [0, 1] consoante o grau de homogeneidade dos grupos em estudo, sabendo-se que o limite inferior implica uma baixa homogeneidade enquanto o limite superior implica elevada homogeneidade⁽¹⁰²⁾.

3.5.7.3.3 Alfa de Cronbach

Este valor pode ser utilizado para medir a variabilidade entre dois observadores que classificam o mesmo grupo de amostras, sendo um indicador da medida de concordância entre os dois grupos de

dados por estimativa de consistência interna a partir das variâncias dos itens e dos totais por sujeito⁽¹⁰³⁾. O nível de concordância dado pelo valor de Alfa distribui-se entre [0, 1] e pode ser interpretado de acordo com o valor obtido de absoluto a muito baixo⁽¹⁰¹⁾ -Tabela 15.

Valor de Alfa	Consistência interna
$\geq .9$	Absoluta
$.9 > \alpha \geq .8$	elevada
$.8 > \alpha \geq .7$	moderada
$.7 > \alpha \geq .6$	baixa
$.5 > \alpha$	Muito baixa

Tabela 15 – Interpretação do Alfa de Cronbach

3.6 Formatação e Linguagem

Na preparação do documento escrito decidiu-se utilizar a língua e terminologia portuguesa para uma melhor e mais homogênea explanação, sendo aplicado o recente acordo ortográfico. Em casos especiais, recorreu-se a terminologia de origem anglo-saxónica que expressa, na opinião do autor, a verdadeira dimensão e conotação de forma mais imediata e simples – Exemplo: score.

A referenciação bibliográfica foi feita pela Norma Internacional ISO 690⁽¹⁰⁴⁾.

3.7 Boas práticas investigacionais

3.7.1 Considerações éticas e deontológicas

Este estudo não implicou qualquer intrusão ou desconforto para com indivíduos ou animais. Nenhum dos intervenientes teve acesso a nomes ou dados clínicos.

Todos os tecidos histológicos utilizados foram recolhidos de material de arquivo redundante, não implicando qualquer comprometimento de diagnósticos, prognósticos ou indicações terapêuticas atuais ou futuros.

3.7.2 Higiene e segurança no laboratório

Ao trabalhar dentro de qualquer laboratório, é importante ter presentes regras de segurança indispensáveis a uma boa prática. Cada indivíduo tem o dever de tomar os procedimentos adequados à salvaguarda da sua saúde e segurança e daqueles que o rodeiam⁽¹⁰⁵⁾.

Tendo em conta que o uso de substâncias tóxicas, corrosivas, inflamáveis, de alta temperatura ou eletricidade potenciam os riscos, cumpriram-se as regras básicas de segurança:

- Conservaram-se as bancadas arrumadas e limpas;
- Procedeu-se a todos os movimentos laboratoriais de forma suave e contínua;
- Fez-se sempre uma adequada manipulação de reagentes;

É também indispensável o uso de equipamentos de proteção individual, como bata, luvas, óculos, máscara e outros, sempre que a situação o justifique. A proteção coletiva representa um importante fator de segurança e é conseguida com adequados sistemas de ventilação e extração de ar, entre outros⁽¹⁰⁵⁾.

Em caso de acidente é importante saber como agir. Para tal, são necessárias noções básicas de primeiros socorros, destacando-se os procedimentos PAS a cumprir em caso de acidente ⁽¹⁰⁵⁾:

1. Prevenir – atuar no sentido de evitar a ocorrência de mais acidentes ou o agravamento dos já ocorridos;
2. Alertar – informar as entidades competentes da ocorrência;
3. Socorrer – abordar os feridos e proceder de acordo com as situações encontradas.

Em caso de ingestão de produto tóxico ou nocivo não se deve provocar o vômito sem indicação expressa de Profissional de Saúde competente ou dar de beber à vítima. Quando um reagente perigoso contacta com os olhos, pele ou mucosas deve lavar-se de imediato e abundantemente a zona afetada com água fria ⁽¹⁰⁵⁾.

Ao assumir uma atitude cautelosa/ponderada e respeitando as regras de segurança laboratorial estamos a contribuir drasticamente para a diminuição do número de acidentes ⁽¹⁰⁶⁾.

3.7.3 Cuidados com material e reagentes

Foram cumpridos vários procedimentos de forma a assegurar a correta execução das técnicas imunohistoquímicas, sendo que um dos principais se prendeu com a escrupulosa utilização do material e reagentes. Todo o material a utilizar estava devidamente limpo, de forma a evitar contaminações ou danos na técnica, e aquele que era descartável foi cuidadosamente separado após utilização.

Os reagentes utilizados foram executados propositadamente para este estudo, garantindo-se a máxima qualidade na sua preparação. As baterias de hidratação/desidratação, com álcool, xilol ou água destilada foram renovadas com frequência, de forma a manter a maior grau de pureza possível.

3.7.3.1 Azida de sódio

Os reagentes biológicos utilizados em imunohistoquímica recorrem à azida de sódio (NaN_3) como conservante. Este produto químico é altamente tóxico na forma pura, no entanto, as concentrações utilizadas nos referidos reagentes (15 mmol/L) são baixas e não apresentam esse risco. Em situações de concentração do produto, embora não sendo classificada como perigosa, a azida de sódio pode reagir com as canalizações de chumbo e de cobre, formando acumulações de azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar o produto, adicionar água abundante para evitar a acumulação de azidas metálicas na canalização ⁽²²⁾.

3.7.3.2 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro

A 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro e está classificada como Nociva (Figura 49) e possui as frases R40 (Possibilidade de efeitos cancerígenos), R43 (Pode causar sensibilização em contacto com a pele), R68 (Possibilidade de efeitos irreversíveis), S35 (Não se desfazer deste produto e do seu recipiente sem tomar as precauções de segurança devidas), S36/37 (Usar vestuário de proteção e luvas adequadas). Este produto poderá ainda ser nocivo por inalação, em contacto com a pele e por ingestão. Uma vez que é irritante para os olhos e pele, recomenda-se, no caso de ocorrer contacto com

olhos ou pele, lavar imediatamente a área afetada com água e sabão. Embora a diaminobenzidina esteja estruturalmente relacionada com a benzidina, não existe qualquer evidência da sua carcinogenicidade⁽²²⁾.



Figura 49 – Símbolo GHS para substância nociva

Fonte: <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/pictograms.html>

Este capítulo apresenta os resultados da análise dos dados obtidos a partir das avaliações realizadas. O capítulo está organizado de forma a apresentar a análise descritiva dos diferentes elementos estudados nesta investigação e a inferência estatística efetuada por cruzamento dos referidos elementos.

4.1 Score Global

4.1.1 Valores gerais

4.1.1.1 Descrição de valores

Verifica-se que o valor mais elevado obtido é 25 e coincide com o máximo admitido pela escala, enquanto o valor mais reduzido é 6, existindo um intervalo de distribuição de 19 pontos. A média é de 19,72, a mediana é 20 e a moda é 22, enquanto o desvio-padrão é 3,87. Poderá ser assumido que, tendo em conta a amplitude de distribuição relativamente espaçada, o valor elevado de média/mediana/moda e a existência de metade dos casos com score superior a 20, que estamos perante resultados, globalmente, elevados em que a maior parte dos elementos se situa nos valores superiores da distribuição ou seja no intervalo aproximado dos 20-25 pontos - Tabela 16 e Tabela 17.

Score Global	Frequência	%	% cumulativa
6	1	,4	,4
7	3	1,3	1,7
11	2	,8	2,5
12	6	2,5	5,0
13	8	3,3	8,3
14	6	2,5	10,8
15	6	2,5	13,3
16	10	4,2	17,5
17	16	6,7	24,2
18	14	5,8	30,0
19	35	14,6	44,6
20	21	8,8	53,3
21	21	8,8	62,1
22	45	18,8	80,8
23	6	2,5	83,3
24	5	2,1	85,4
25	35	14,6	100,0
Total	240	100,0	

Tabela 16 - Frequências de Score Global

4.1.1.2 Descrição da forma

A média tem um valor inferior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-0,838). A curtose assume valores positivos (0,877) que indicam uma distribuição leptocúrtica - Tabela 17.

O teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) mostra que esta variável não segue uma distribuição normal ($p=,001$). O histograma apresentado também sugere um afastamento relativamente à curva normal - Figura 50.

	Parâmetro	Valor
Score Global	Média	19,72
	Mediana	20,00
	Moda	22
	Desvio-Padrão	3,877
	Assimetria	-,838
	Curtose	,877
	Máximo	25
	Mínimo	6

Tabela 17 - Estatística descritiva de Score Global

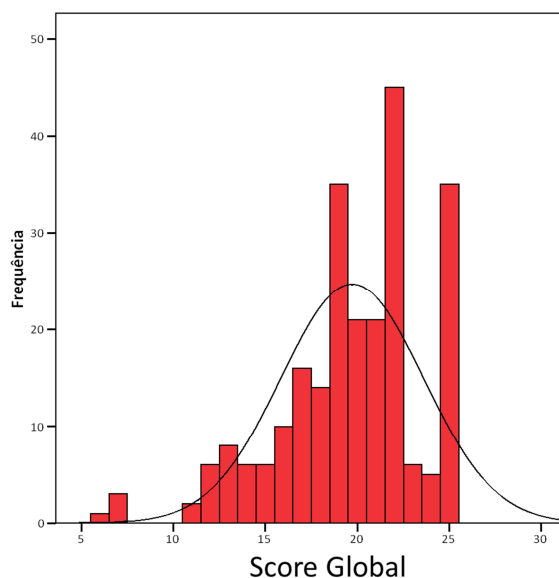


Figura 50 – Distribuição de Score Global

4.1.2 Score Global EnVision+

4.1.2.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25 e coincide com o máximo admitido pela escala, enquanto o valor mais reduzido é 7, existindo um intervalo de distribuição de 18 pontos. A média é de 17,43, a mediana é 18,5 e a moda é 19, enquanto o desvio-padrão é 3,86. Poderá ser assumido desta forma que, tendo em conta a amplitude de distribuição espaçada, o valor elevado de média/mediana/moda que estamos perante resultados bastante elevados em que a maior parte dos elementos se situa nos valores superiores da distribuição - Tabela 18 e Figura 51.

4.1.2.2 Descrição da forma

A média tem um valor inferior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-0,651). A curtose assume valores positivos (0,401) que indicam uma distribuição leptocúrtica - Tabela 18.

O teste de K-S mostra que esta variável segue uma distribuição normal ($p=,101$) e o histograma da distribuição também sugere uma sobreposição à curva normal - Figura 52.

Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
EnVision+	Média	17,43
	Mediana	18,50
	Moda	19
	Desvio-Padrão	3,859
	Assimetria	-,651
	Curtose	,401
	Máximo	25
	Mínimo	7

Tabela 18 - Estatística descritiva de Score Global EnVision+

4.1.3 Score Global ImmPRESS

4.1.3.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25, enquanto o valor mais reduzido é 6, existindo um intervalo de distribuição de 19 pontos. A média é de 18,47, a mediana é 19 e a moda é 22, sendo que o desvio-padrão é 4,098. Poderá ser assumido desta forma que, tendo em conta a amplitude de distribuição espaçada, o valor elevado de média/mediana/moda que estamos perante resultados bastante elevados em que a maior parte dos elementos se situa nos valores superiores da distribuição - Tabela 19 e Figura 51.

4.1.3.2 Descrição da forma

A média tem um valor inferior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-0,715). A curtose assume valores positivos (0,856) que indicam uma distribuição leptocúrtica - Tabela 19.

O teste de K-S mostra que esta variável segue uma distribuição normal ($p=,660$) e o histograma da distribuição também sugere uma sobreposição à curva normal - Figura 52.

Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
ImmPRESS	Média	18,47
	Mediana	19,00
	Moda	22
	Desvio-Padrão	4,098
	Assimetria	-,715
	Curtose	,856
	Máximo	25
	Mínimo	6

Tabela 19 - Estatística descritiva de Score Global ImmPRESS

4.1.4 Score Global UltraVision

4.1.4.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25, enquanto o valor mais reduzido é 12, existindo um intervalo de distribuição de 13 pontos. A média é de 20,43, a mediana é 21, a moda é 22 e o desvio-padrão é 2,849. Mesmo tendo em conta a amplitude de distribuição relativamente espaçada, o valor elevado de média/mediana/moda e o valor relativamente reduzido de desvio-padrão permite assumir que estamos perante resultados, no geral, bastante elevados em que a maior parte dos elementos se situa nos valores superiores da distribuição - Tabela 20 e Figura 51.

4.1.4.2 Descrição da forma

A média tem um valor inferior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-0,579). A curtose assume valores positivos (0,702) que indicam uma distribuição leptocúrtica - Tabela 20.

Também aqui o teste de K-S mostra que esta variável segue uma distribuição normal ($p=,183$) e o histograma da distribuição também sugere uma sobreposição à curva normal - Figura 52.

Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
UltraVision	Média	20,43
	Mediana	21,00
	Moda	22
	Desvio-Padrão	2,849
	Assimetria	-,579
	Curtose	,702
	Máximo	25
	Mínimo	12

Tabela 20 - Estatística descritiva de Score Global UltraVision

4.1.5 Score Global Novolink

4.1.5.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25, enquanto o valor mais reduzido é 17, existindo um intervalo de distribuição de somente 7 pontos. A média é de 22,53, a mediana é 22, a moda é 25 e o desvio-padrão é 2,368. Tendo em conta a amplitude de distribuição relativamente curta, o valor muito elevado de média/mediana/moda e o valor reduzido de desvio-padrão permitem assumir que estamos perante resultados muito elevados em que a esmagadora maioria elementos se situa nos valores superiores da distribuição - Tabela 21 e Figura 51.

4.1.5.2 Descrição da forma

A média tem um valor superior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a esquerda, não confirmado pela assimetria negativa (-0,629). A curtose assume valores negativos (-0,444) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 21.

Finalmente para este sistema de amplificação, o teste de K-S mostra que esta variável não segue uma distribuição normal ($p=,016$). O histograma apresentado também sugere um afastamento relativamente à curva normal - Figura 52.

Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
Novolink	Média	22,53
	Mediana	22,00
	Moda	25
	Desvio-Padrão	2,368
	Assimetria	-,629
	Curtose	-,444
	Máximo	25
	Mínimo	17

Tabela 21 - Estatística descritiva de Score Global Novolink

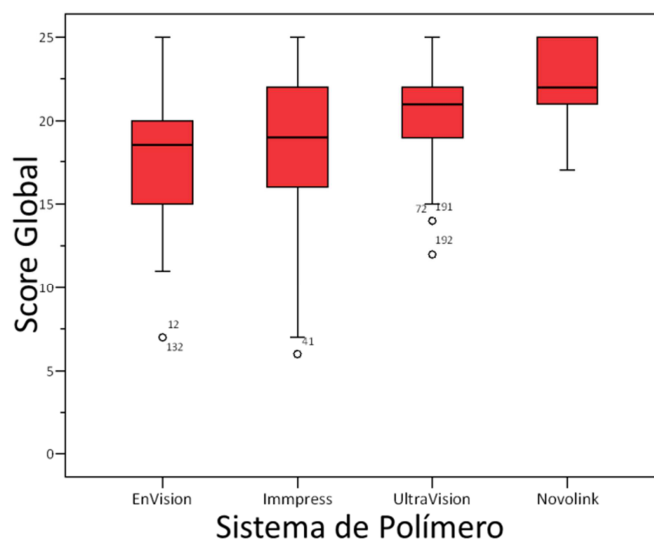


Figura 51 – Diagrama de caixas para os sistemas de polímero em estudo

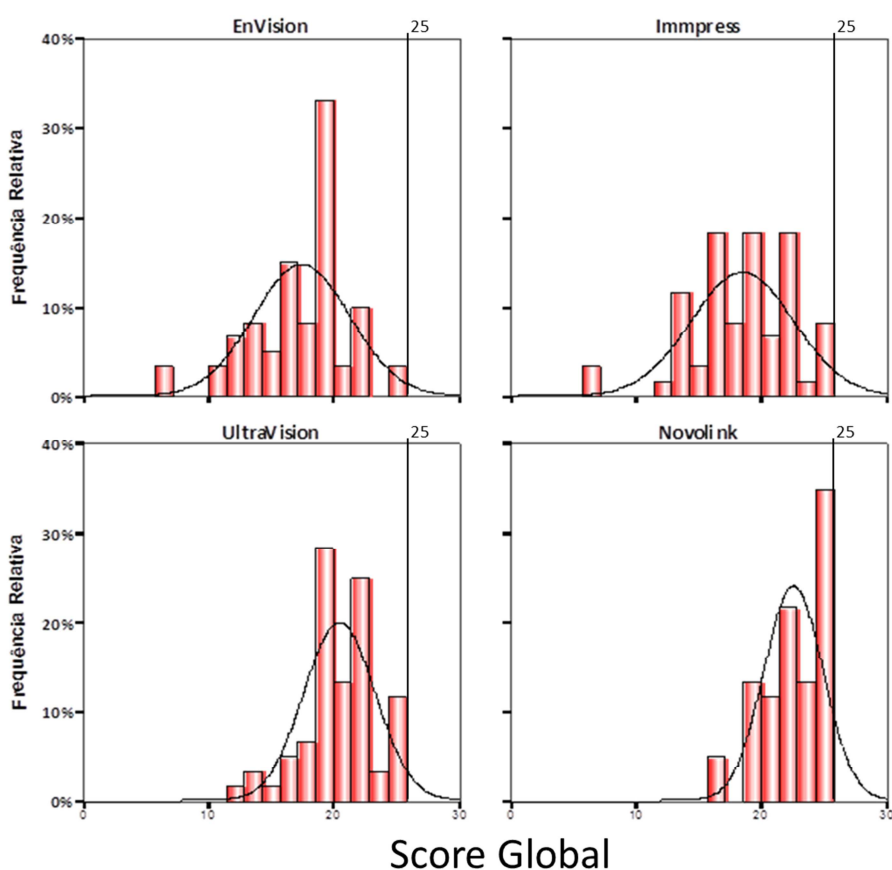


Figura 52 – Histograma de Score Global para os sistemas de polímero em estudo

4.1.6 Análise geral dos sistemas de polímero

O Score Global médio mais elevado (22,53) foi conquistado pelo NovoLink e o Score Global médio mais reduzido foi o do EnVision+ (17,43). O sistema UltraVision obteve um resultado final de 20,43 e o ImmPRESS 18,47. Relativamente à dispersão dos resultados podemos verificar que o NovoLink é o que apresenta menor desvio-padrão (2,37) e que o sistema ImmPRESS é aquele que demonstra mai-

or dispersão (4,1). No caso do EnVision+ verifica-se a existência de um desvio-padrão de 3,86 e no caso do UltraVision de 2,85 – Figura 53.

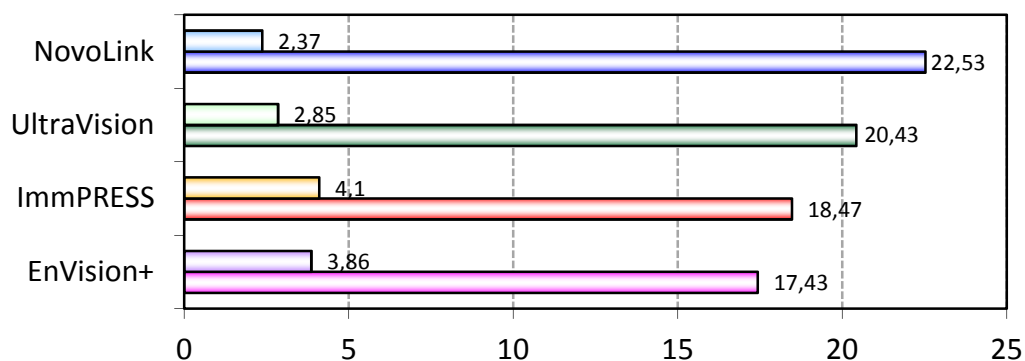


Figura 53 – Média e desvio-padrão do Score Global para os sistemas estudados

A aplicação do teste *one-way* ANOVA indicou a presença de diferenças entre os sistemas de amplificação ($p=,000$). Os valores obtidos com o teste *post-hoc* de Tukey permitem constatar que as técnicas apresentam as seguintes relações: o sistema EnVision+ obteve resultados estatisticamente equivalentes ao ImmPRESS e inferiores aos UltraVision e NovoLink ($p=,000$). O sistema ImmPRESS obteve resultados estatisticamente inferiores aos UltraVision ($p=,009$) e NovoLink ($p=,000$). O sistema UltraVision obteve resultados estatisticamente inferiores ao NovoLink ($p=,004$) - Tabela 22.

(I) Sistema	(J) Sistema	Diferença entre médias (I-J)	Sig.
EnVision+	ImmPRESS	-1,033	,337
	UltraVision	-3,000	,000
	NovoLink	-5,100	,000
ImmPRESS	EnVision+	1,033	,337
	UltraVision	-1,967	,009
	NovoLink	-4,067	,000
UltraVision	EnVision+	3,000	,000
	ImmPRESS	1,967	,009
	NovoLink	-2,100	,004
NovoLink	EnVision+	5,100	,000
	ImmPRESS	4,067	,000
	UltraVision	2,100	,004

Tabela 22 – *One-Way* ANOVA - Tukey HSD para os sistemas em função do Score Global.

Estes resultados são corroborados pelas imagens das marcações efetuadas para o antigénio CD45RA - Figura 54.

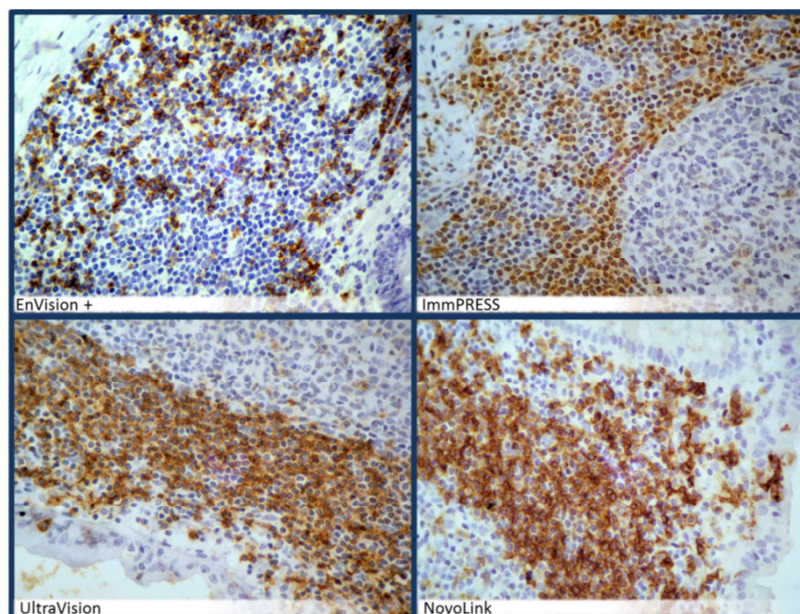


Figura 54 – Imunomarcção para CD45RA – ampliação 400x

4.2 Antígenos de membrana celular

4.2.1 Score EnVision+

4.2.1.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25 e coincide com o máximo admitido pela escala, enquanto o valor mais reduzido é 7, existindo um intervalo de distribuição de 18 pontos. A média é de 14,83, a mediana é 12 e a moda é 12, enquanto o desvio-padrão é 6,013. Poderá ser assumido desta forma que, apesar da amplitude de distribuição espaçada, o valor intermédio de média/mediana/moda parecem indicar que estamos perante resultados que, na sua maior parte, estão próximos do ponto médio da escala disponível - Tabela 23 e Figura 55.

4.2.1.2 Descrição da forma

A média tem um valor superior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a esquerda, confirmado pela assimetria positiva (0,382). A curtose assume valores negativos (-1,105) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 23.

Marcadores de membrana celular		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
EnVision+	Média	14,83
	Mediana	12,00
	Moda	12
	Desvio-Padrão	6,013
	Assimetria	,382
	Curtose	-1,105
	Máximo	25
	Mínimo	7

Tabela 23 - Estatística descritiva de Score Global EnVision+ em membrana celular

4.2.2 Score ImmPRESS

4.2.2.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 22, enquanto o valor mais reduzido é 6, existindo um intervalo de distribuição de 16 pontos. A média é de 15,83, a mediana é 17, a moda é 16 e o desvio-padrão é 5,219. Assim, apesar da amplitude de distribuição espaçada, o valor ligeiramente elevado de média/mediana/moda parecem indicar que estamos perante resultados que, na sua maior parte, estão ligeiramente acima do ponto médio da escala disponível - Tabela 24 e Figura 55.

4.2.2.2 Descrição da forma

A média tem um valor inferior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-0,908). A curtose assume valores negativos (-0,137) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 24.

Marcadores de membrana celular		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
ImmPRESS	Média	15,83
	Mediana	17,00
	Moda	16
	Desvio-Padrão	5,219
	Assimetria	-,908
	Curtose	-,137
	Máximo	22
	Mínimo	6

Tabela 24 - Estatística descritiva de Score Global ImmPRESS em membrana celular

4.2.3 Score UltraVision

4.2.3.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 24, enquanto o valor mais reduzido é 12, existindo um intervalo de distribuição de 12 pontos. A média é de 18,33, a mediana é 19, a moda é 19 e o desvio-padrão é 3,725. Apesar da amplitude de distribuição relativamente espaçada, o valor elevado de média/mediana/moda parecem indicar que estamos perante resultados que, na sua maior parte, estão bem acima do ponto médio da escala disponível - Tabela 25 e Figura 55.

4.2.3.2 Descrição da forma

A média tem um valor inferior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-0,378). A curtose assume valores negativos (-0,958) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 25.

Marcadores de membrana celular		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
UltraVision	Média	18,33
	Mediana	19,00
	Moda	19
	Desvio-Padrão	3,725
	Assimetria	-,378
	Curtose	-,958
	Máximo	24
	Mínimo	12

Tabela 25 - Estatística descritiva de Score Global UltraVision em membrana celular

4.2.4 Score Novolink

4.2.4.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25, enquanto o valor mais reduzido é 17, existindo um intervalo de distribuição de somente 8 pontos. A média é de 21,67, a mediana e a moda são 22, enquanto o desvio-padrão é 7,879. Poderá ser assumido que a amplitude de distribuição reduzida e o valor muito elevado de média/mediana/moda parecem indicar que estamos perante resultados que, na sua esmagadora maioria, estão muito próximos do ponto máximo da escala disponível- Tabela 26 e Figura 55.

4.2.4.2 Descrição da forma

A média tem um valor inferior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-,537). A curtose assume também valores negativos (-,548) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 26.

Marcadores de membrana celular		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
Novolink	Média	21,67
	Mediana	22,00
	Moda	22
	Desvio-Padrão	2,807
	Assimetria	-,537
	Curtose	-,548
	Máximo	25
	Mínimo	17

Tabela 26 - Estatística descritiva de Score Global Novolink em membrana celular

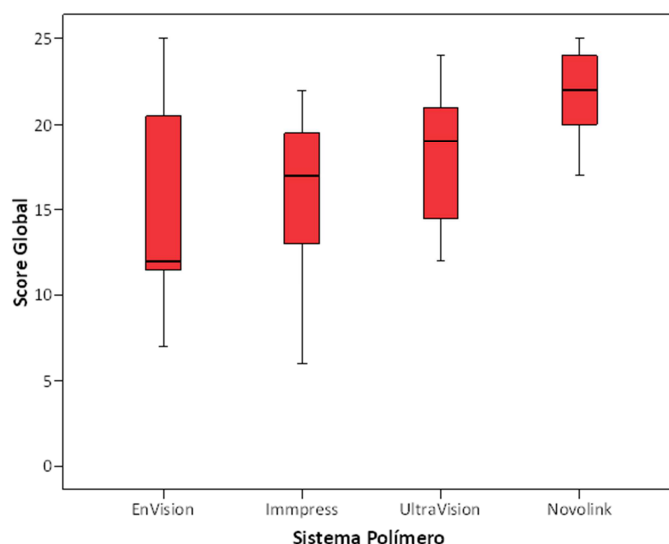


Figura 55 – Distribuição de Score Global relativo a antígenios de membrana celular

4.2.5 Análise dos sistemas de polímero

O Score médio mais elevado (21,67) foi o do NovoLink e o Score médio mais reduzido foi para o EnVision+ (14,83). O sistema UltraVision obteve um resultado de 18,33 e o ImmPRESS 15,83. Relativamente à dispersão dos resultados podemos verificar que o NovoLink é o que apresenta menor des-

vio-padrão (2,807) e que o sistema EnVision+ é aquele que demonstra maior dispersão (6,013). No caso do ImmPRESS verifica-se a existência de um desvio-padrão de 5,219 e no caso do UltraVision de 3,725 – Figura 56.

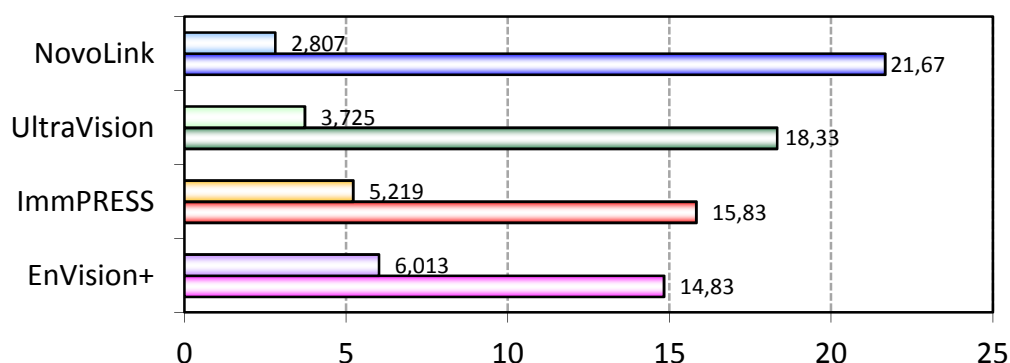


Figura 56 – Média e desvio-padrão do Score Global dos antigénios de membrana celular para os sistemas estudados

A aplicação do teste *one-way* ANOVA indicou a presença de diferenças relevantes entre os sistemas de amplificação ($p=,004$). Os valores obtidos com o teste *post-hoc* de Tukey permitem constatar que as técnicas apresentam as seguintes relações: o sistema EnVision+ obteve resultados estatisticamente equivalentes a ImmPRESS e UltraVision e inferiores ao NovoLink ($p=,004$). O sistema ImmPRESS obteve resultados estatisticamente inferiores ao NovoLink ($p=,017$) - Tabela 27.

(I) Sistema	(J) Sistema	Diferença entre médias (I-J)	Sig.
EnVision+	ImmPRESS	-1,000	,951
	UltraVision	-3,500	,261
	NovoLink	-6,833	,004
ImmPRESS	EnVision+	1,000	,951
	UltraVision	-2,500	,551
	NovoLink	-5,833	,017
UltraVision	EnVision+	3,500	,261
	ImmPRESS	2,500	,551
	NovoLink	-3,333	,301
NovoLink	EnVision+	6,833	,004
	ImmPRESS	5,833	,017
	UltraVision	3,333	,301

Tabela 27 – *One-Way* ANOVA - Tukey HSD em função do Score Global dos marcadores de membrana celular. Estes resultados são corroborados pelas imagens das marcações efetuadas para o antigénio CD8 - Figura 57.

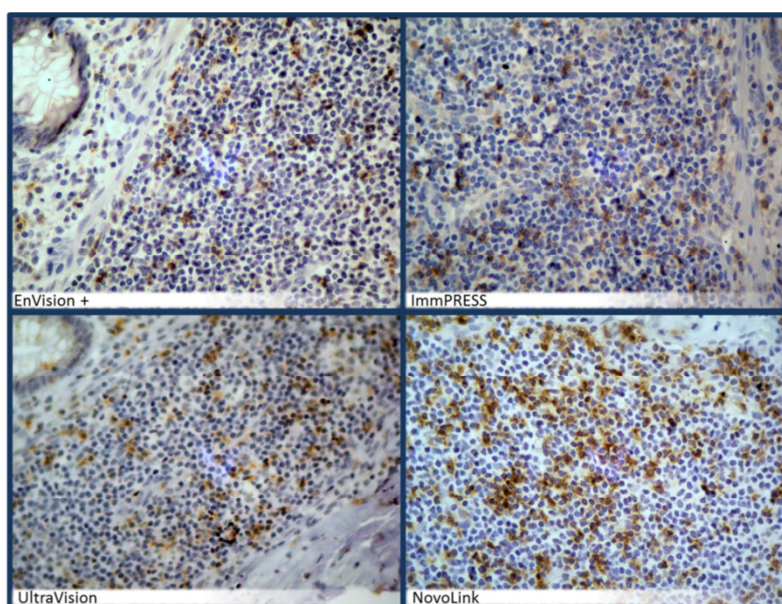


Figura 57 – Imunomarcção para CD8 – ampliação 400x

4.3 Antígenos de citoplasma

4.3.1 Score EnVision+

4.3.1.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25 e coincide com o máximo admitido pela escala, enquanto o valor mais reduzido é 11, existindo um intervalo de distribuição de 14 pontos. A média é de 18,03, a mediana e a moda são de 19 e o desvio-padrão é 2,939. Poderá ser assumido desta forma que, apesar da amplitude de distribuição relativamente espaçada, o valor relativamente elevado de média/mediana/moda e o baixo desvio-padrão parecem indicar que estamos perante resultados que, na sua maior parte, estão bastante acima do ponto médio da escala disponível - Tabela 28 e Figura 58.

4.3.1.2 Descrição da forma

A média tem um valor inferior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-,313). A curtose assume valores muito reduzidos (,127) que indicam uma distribuição mesocúrtica - Tabela 28.

Marcadores de citoplasma		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
EnVision+	Média	18,03
	Mediana	19,00
	Moda	19
	Desvio-Padrão	2,939
	Assimetria	-,313
	Curtose	,127
	Máximo	25
	Mínimo	11

Tabela 28 - Estatística descritiva de Score Global EnVision+ em citoplasma

4.3.2 Score ImmPRESS

4.3.2.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25, enquanto o valor mais reduzido é 13, existindo um intervalo de distribuição de 12 pontos. A média é de 18,85, a mediana é 19, a moda é 22 e o desvio-padrão é 3,490. Assim, apesar da amplitude de distribuição relativamente espaçada, o valor elevado de média/mediana/moda e o valor reduzido do desvio-padrão indicam que estamos perante resultados que, na sua maior parte, estão próximos do ponto máximo da escala disponível - Tabela 29 e Figura 58.

4.3.2.2 Descrição da forma

A média tem um valor ligeiramente inferior ao da mediana, sugerindo um ligeiro enviesamento para a direita, que não é confirmado pela assimetria de valor extremamente reduzido (-,131), ou seja a distribuição parece ser simétrica. A curtose assume valores negativos (-,771) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 29.

Marcadores de citoplasma		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
ImmPRESS	Média	18,85
	Mediana	19,00
	Moda	22
	Desvio-Padrão	3,490
	Assimetria	-,131
	Curtose	-,771
	Máximo	25
	Mínimo	13

Tabela 29 - Estatística descritiva de Score Global ImmPRESS em citoplasma

4.3.3 Score UltraVision

4.3.3.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25, enquanto o valor mais reduzido é 17, existindo um intervalo de distribuição de somente 8 pontos. A média é de 21,28, a mediana é 21, a moda é 22 e o desvio-padrão é 2,242. A amplitude de distribuição pouco espaçada, o valor elevado de média/mediana/moda e o valor reduzido do desvio-padrão parecem indicar que estamos perante resultados que, na sua maior parte, estão próximos do ponto máximo da escala disponível - Tabela 30 e Figura 58.

4.3.3.2 Descrição da forma

A média tem um valor ligeiramente superior ao da mediana, sugerindo um pequeno enviesamento para a esquerda, confirmado pela assimetria positiva (,255). A curtose assume valores negativos (-,625) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 30.

Marcadores de citoplasma		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
UltraVision	Média	21,28
	Mediana	21,00
	Moda	22
	Desvio-Padrão	2,242
	Assimetria	,255
	Curtose	-,625
	Máximo	25
	Mínimo	17

Tabela 30 - Estatística descritiva de Score Global UltraVision em citoplasma

4.3.4 Score Novolink

4.3.4.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25 e o valor mais reduzido é 19, existindo um intervalo de distribuição de somente 6 pontos. A média é de 23,00, a mediana é 23,50 e a moda é 25, enquanto o desvio-padrão é 2,051. A amplitude de distribuição/desvio-padrão muito reduzidos e o valor muito elevado de média/mediana/moda, indicam que estamos perante resultados que, na sua esmagadora maioria, estão muito próximos do ponto máximo da escala disponível - Tabela 31 e Figura 58.

4.3.4.2 Descrição da forma

A média tem um valor inferior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-,526). A curtose assume também valores negativos (-1,060) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 31.

Marcadores de citoplasma		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
Novolink	Média	23,00
	Mediana	23,50
	Moda	25
	Desvio-Padrão	2,051
	Assimetria	-,526
	Curtose	-1,060
	Máximo	25
	Mínimo	19

Tabela 31 - Estatística descritiva de Score Global Novolink em citoplasma

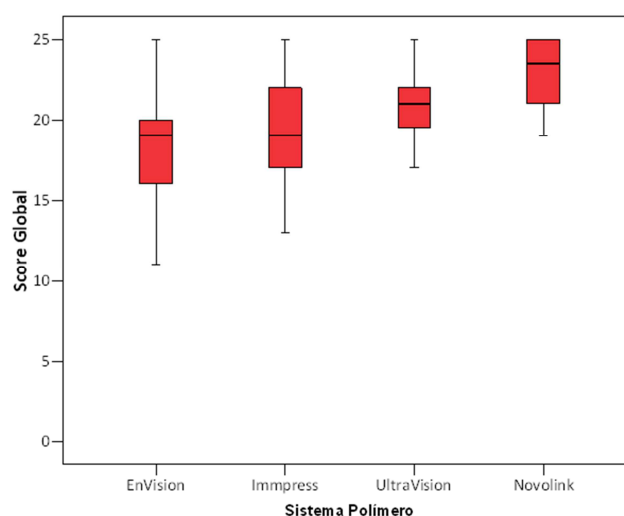


Figura 58 – Distribuição de Score Global relativo a antígenos de citoplasma

4.3.5 Análise dos sistemas de polímero

O Score médio mais elevado (23,00) foi o do NovoLink e o Score médio mais reduzido foi para o EnVision+ (18,03). O sistema UltraVision obteve um resultado de 21,28 e o ImmPRESS 18,85. Relativamente à dispersão dos resultados podemos verificar que o NovoLink é o que apresenta menor desvio-padrão (2,051) e que o sistema ImmPRESS é aquele que demonstra maior dispersão (3,49). No caso do EnVision+ verifica-se a existência de um desvio-padrão de 2,939 e no caso do UltraVision de 2,242 – Figura 59

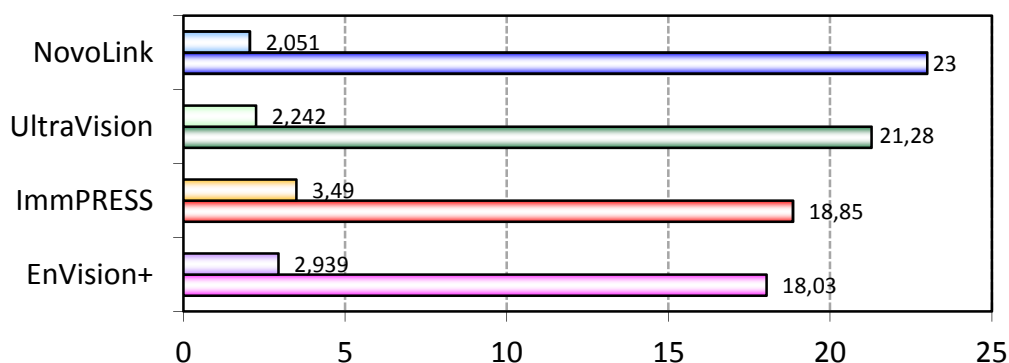


Figura 59 – Média e desvio-padrão do Score Global dos antígenos de citoplasma para os sistemas estudados. A aplicação do teste *one-way* ANOVA indicou a presença de diferenças relevantes entre os sistemas de amplificação ($p=,000$). Os valores do teste *post-hoc* de Tukey permitem constatar que as técnicas apresentam as seguintes relações - Tabela 32:

- O sistema EnVision+ obteve resultados estatisticamente equivalentes ao sistema ImmPRESS e inferiores aos UltraVision e NovoLink ($p=,000$).
- O sistema ImmPRESS obteve resultados estatisticamente inferiores aos UltraVision ($p=,001$) e NovoLink ($p=,000$).
- O sistema UltraVision obteve resultados estatisticamente inferiores ao NovoLink ($p=,028$).

(I) Sistema	(J) Sistema	Diferença entre médias (I-J)	Sig.
EnVision+	ImmPRESS	-,825	,535
	UltraVision	-3,250	,000
	NovoLink	-4,975	,000
ImmPRESS	EnVision+	,825	,535
	UltraVision	-2,425	,001
	NovoLink	-4,150	,000
UltraVision	EnVision+	3,250	,000
	ImmPRESS	2,425	,001
	NovoLink	-1,725	,028
NovoLink	EnVision+	4,975	,000
	ImmPRESS	4,150	,000
	UltraVision	1,725	,028

Tabela 32 – *One-Way* ANOVA - Tukey HSD em função do Score Global dos marcadores de citoplasma. Estes resultados são corroborados pelas imagens das marcações efetuadas para o antígeno Desmina - Figura 60

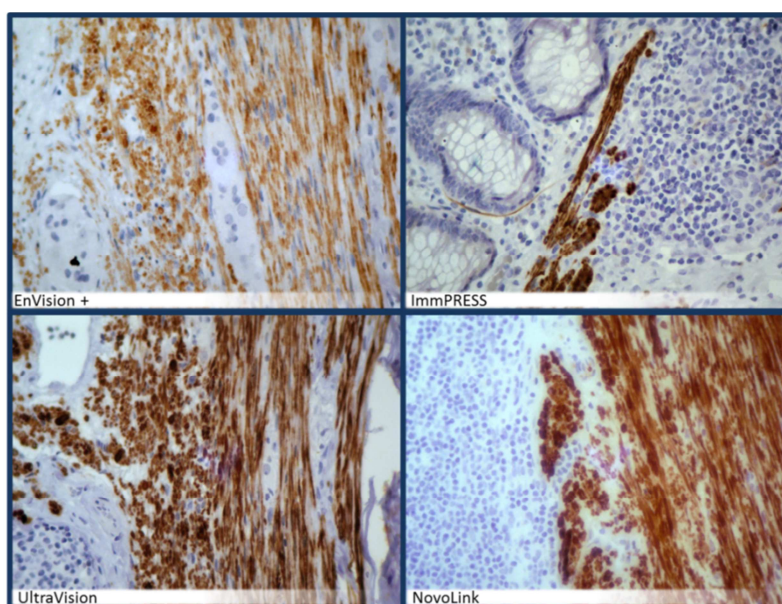


Figura 60 – Imunomarcção para Desmina – ampliação 400x

4.4 Antígenos de núcleo

4.4.1 Score EnVision+

4.4.1.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 22, enquanto o valor mais reduzido é 15, existindo um intervalo de distribuição de 7 pontos. A média é de 18,38, a mediana é 18,50 e a moda é 18, enquanto o desvio-padrão é 2,446. Poderá ser assumido assim que a amplitude de distribuição/desvio-padrão relativamente baixos e o valor ligeiramente elevado de média/mediana/moda, parecem indicar que estamos perante resultados bastante homogêneos que, na sua maior parte, estão ligeiramente acima do ponto médio da escala disponível - Tabela 33 e Figura 61.

4.4.1.2 Descrição da forma

A média tem um valor ligeiramente inferior ao da mediana, sugerindo um pequeno enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-,267). A curtose assume valores negativos (-,624) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 33.

Marcadores de núcleo		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
EnVision+	Média	18,38
	Mediana	18,50
	Moda	18
	Desvio-Padrão	2,446
	Assimetria	-,267
	Curtose	-,624
	Máximo	22
	Mínimo	15

Tabela 33 - Estatística descritiva de Score Global EnVision+ em núcleo

4.4.2 Score ImmPRESS

4.4.2.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25, enquanto o valor mais reduzido é 15, existindo um intervalo de distribuição de 10 pontos. A média é de 20,5, a mediana é 21, a moda é 22 e o desvio-padrão é 3,665. Com uma amplitude de distribuição relativamente curta, um valor elevado de média/mediana/moda e um valor reduzido do desvio-padrão, estamos perante resultados que são bastante homogêneos e, na sua maior parte, estão próximos do ponto máximo da escala disponível - Tabela 34 e Figura 61.

4.4.2.2 Descrição da forma

A média tem um valor ligeiramente inferior ao da mediana, sugerindo um ligeiro enviesamento para a direita, que não é confirmado pela assimetria de valor extremamente reduzido (-,139), ou seja a distribuição parece ser simétrica. A curtose assume valores negativos (-1,222) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 34.

Marcadores de núcleo		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
ImmPRESS	Média	20,50
	Mediana	21,00
	Moda	22
	Desvio-Padrão	3,665
	Assimetria	-,139
	Curtose	-1,222
	Máximo	25
	Mínimo	15

Tabela 34 - Estatística descritiva de Score Global ImmPRESS em núcleo

4.4.3 Score UltraVision

4.4.3.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 22, enquanto o valor mais reduzido é 16, implicando um intervalo de distribuição de somente 6 pontos. A média é de 19,38, a mediana é 19 e a moda é 22, enquanto o desvio-padrão é 2,387. A amplitude de distribuição pouco espaçada, o valor elevado de média/mediana/moda e o valor reduzido do desvio-padrão parecem indicar que estamos perante resultados que são muito homogêneos e, na sua maior parte, estão próximos do ponto máximo da escala disponível - Tabela 35 e Figura 61.

4.4.3.2 Descrição da forma

A média tem um valor ligeiramente superior ao da mediana, sugerindo um pequeno enviesamento para a esquerda, que não é confirmado pela assimetria de valor extremamente reduzido (-,004), ou seja a distribuição parece ser simétrica. A curtose assume valores negativos (-1,650) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 35.

Marcadores de núcleo		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
UltraVision	Média	19,38
	Mediana	19,00
	Moda	22
	Desvio-Padrão	2,387
	Assimetria	-,004
	Curtose	-1,650
	Máximo	22
	Mínimo	16

Tabela 35 - Estatística descritiva de Score Global UltraVision em núcleo

4.4.4 Score Novolink

4.4.4.1 Descrição de valores

O valor mais elevado obtido é 25, enquanto o valor mais reduzido é 17, existindo um intervalo de distribuição de somente 8 pontos. A média é de 21,50, a mediana e a moda são de 22, enquanto o desvio-padrão é 2,777. A amplitude de distribuição/desvio-padrão muito reduzidos e o valor muito elevado de média/mediana/moda, indicam que estamos perante resultados que sendo homogêneos estão, na sua esmagadora maioria, muito próximos do ponto máximo da escala disponível - Tabela 36 e Figura 61.

4.4.4.2 Descrição da forma

A média tem um valor inferior ao da mediana, sugerindo um enviesamento para a direita, confirmado pela assimetria negativa (-,213). A curtose assume também valores negativos (-,553) que indicam uma distribuição platicúrtica - Tabela 36.

Marcadores de núcleo		
Sistema Polímero	Parâmetro	Valor
Novolink	Média	21,50
	Mediana	22
	Moda	22
	Desvio-Padrão	2,777
	Assimetria	-,213
	Curtose	-,553
	Máximo	25
	Mínimo	17

Tabela 36 - Estatística descritiva de Score Global Novolink em núcleo

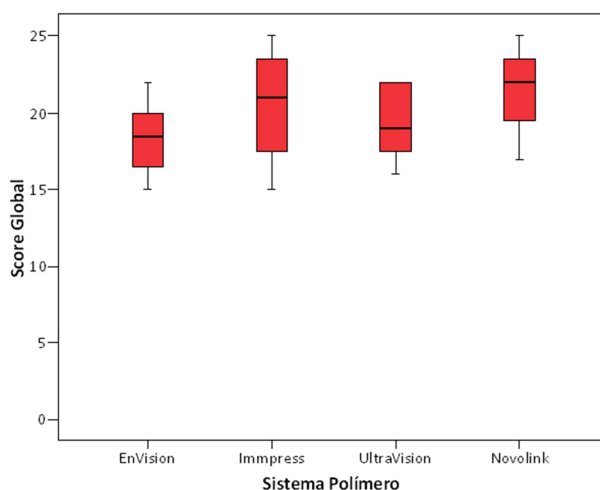


Figura 61 – Distribuição de Score Global relativo a antígenos nucleares

4.4.5 Análise dos sistemas de polímero

O Score médio mais elevado (21,5) foi o do NovoLink e o Score médio mais reduzido foi para o EnVision+ (18,38). O sistema UltraVision obteve um resultado de 19,38 e o ImmPRESS 20,5. Relativamente à dispersão dos resultados podemos verificar que o UltraVision é o que apresenta menor desvio-padrão (2,387) e que o sistema ImmPRESS é aquele que demonstra maior dispersão (3,665). No caso do NovoLink verifica-se a existência de um desvio-padrão de 2,777 e no caso do EnVision+ de 2,446 – Figura 62.

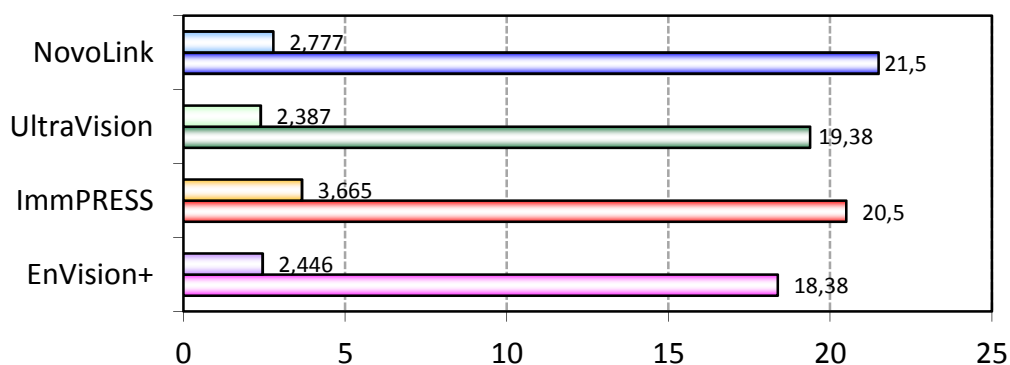


Figura 62 – Média e desvio-padrão do Score Global dos antígenos de núcleo para os sistemas estudados. A aplicação do teste Kruskal-Wallis permitiu-nos verificar a inexistência de diferenças relevantes entre os sistemas de amplificação. Este resultado é, sem dúvida fortemente condicionado pelo baixo número de amostras agrupadas nos marcadores de antígenos nucleares (n=36). No entanto, da análise das imagens das marcações efetuadas para o antígeno PgR pode verificar-se a qualidade de cada uma - Figura 63.

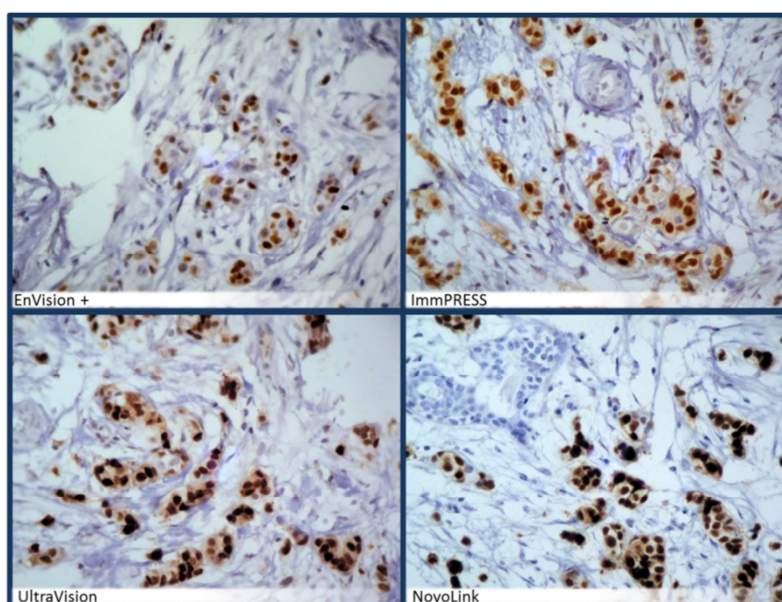


Figura 63 – Imunomarcação para PgR – ampliação 400x

4.5 Parâmetros da grelha de avaliação da imunomarcção

4.5.1 Intensidade de imunomarcção

Na totalidade dos casos e para o parâmetro intensidade de imunomarcção obteve-se uma moda da opção *forte* que recolheu 42,5% do total de respostas. A opção menos observada foi *nula* com somente 1,7% das escolhas - Tabela 37.

Intensidade de imunomarcção	Frequência	%
Nula	4	1,7
Fraca	25	10,4
Moderada	60	25,0
Forte	102	42,5
Muito forte	49	20,4
Total	240	100,0

Tabela 37 - Frequências de intensidade de imunomarcção geral

4.5.1.1 Sistema EnVision+

Para o sistema EnVision+, no parâmetro intensidade de imunomarcção, obteve-se uma moda da opção *moderada* que recolheu 38,3% do total de respostas. A opção menos observada foi *nula* com somente 3,3% das escolhas - Tabela 38.

Intensidade de imunomarcção	Frequência	%
Nula	2	3,3
Fraca	13	21,7
Moderada	23	38,3
Forte	20	33,3
Muito forte	2	3,3
Total	60	100,0

Tabela 38 - Frequências de intensidade de imunomarcção EnVision+

4.5.1.2 Sistema ImmPRESS

Com o polímero ImmPRESS, no parâmetro intensidade de imunomarcção, obteve-se uma moda da opção *moderada* que recolheu 38,3% do total de respostas. A opção menos observada foi *nula* com somente 3,3% das escolhas - Tabela 39.

Intensidade de imunomarcção	Frequência	%
Nula	2	3,3
Fraca	8	13,3
Moderada	23	38,3
Forte	21	35,0
Muito forte	6	10,0
Total	60	100,0

Tabela 39 - Frequências de intensidade de imunomarcção ImmPRESS

4.5.1.3 Sistema UltraVision

Para o sistema UltraVision, no parâmetro intensidade de imunomarcção, obteve-se uma moda da opção *forte* que recolheu 60% do total de respostas. A opção menos observada foi *nula* com 0% das escolhas - Tabela 40.

Intensidade de imunomarcacão	Frequência	%
Nula	0	0
Fraca	4	6,7
Moderada	9	15,0
Forte	36	60,0
Muito forte	11	18,3
Total	60	100,0

Tabela 40 - Frequências de intensidade de imunomarcacão UltraVision

4.5.1.4 Sistema Novolink

Finalmente, no caso do sistema Novolink, no parâmetro intensidade de imunomarcacão, obteve-se uma moda da opção *muito forte* que recolheu 50% do total de respostas. As opções menos observadas foram *nula* e *fraca* sem qualquer escolha - Tabela 41.

Intensidade de imunomarcacão	Frequência	%
Nula	0	0
Fraca	0	0
Moderada	5	8,3
Forte	25	41,7
Muito forte	30	50,0
Total	60	100,0

Tabela 41 - Frequências de intensidade de imunomarcacão Novolink

4.5.2 Imunomarcacão específica

Na totalidade dos casos e para o parâmetro imunomarcacão específica, obteve-se uma moda da opção *Marcação em 67 a 100% do alvo* que recolheu 65,8% do total de respostas. A opção menos observada foi *0% de marcação do alvo* com somente 1,7% das escolhas - Tabela 42.

Imunomarcacão específica	Frequência	%
0% de marcação do alvo	4	1,7
Marcação de 1 a 33% do alvo	12	5,0
Marcação em 34 a 66% do alvo	66	27,5
Marcação em 67 a 100% do alvo	158	65,8
Total	240	100,0

Tabela 42 - Frequências de imunomarcacão específica geral

4.5.2.1 Sistema EnVision+

Para o sistema EnVision+ no parâmetro imunomarcacão específica, obteve-se uma moda da opção *Marcação em 67 a 100% do alvo* que recolheu 50% do total de respostas. A opção menos observada foi *0% de marcação do alvo* com somente 3,3% das escolhas - Tabela 43.

Imunomarcacão específica	Frequência	%
0% de marcação do alvo	2	3,3
Marcação de 1 a 33% do alvo	9	15,0
Marcação em 34 a 66% do alvo	19	31,7
Marcação em 67 a 100% do alvo	30	50,0
Total	60	100,0

Tabela 43 - Frequências de imunomarcacão específica EnVision+

4.5.2.2 Sistema ImmPRESS

Para o sistema ImmPRESS no parâmetro imunomarcacão específica, obteve-se uma moda da opção *Marcação em 67 a 100% do alvo* que recolheu 55% do total de respostas. A opção menos observada foi *0% de marcação do alvo* com somente 3,3% das escolhas - Tabela 44.

Imunomarcação específica	Frequência	%
0% de marcação do alvo	2	3,3
Marcação de 1 a 33% do alvo	2	3,3
Marcação em 34 a 66% do alvo	23	38,3
Marcação em 67 a 100% do alvo	33	55,0
Total	60	100,0

Tabela 44 - Frequências de imunomarcação específica ImmPRESS

4.5.2.3 Sistema UltraVision

Para o sistema UltraVision no parâmetro imunomarcação específica, obteve-se uma moda da opção *Marcação em 67 a 100% do alvo* que recolheu 71,7% do total de respostas. A opção menos observada foi *0% de marcação do alvo* com 0% das escolhas - Tabela 45.

Imunomarcação específica	Frequência	%
0% de marcação do alvo	0	0
Marcação de 1 a 33% do alvo	1	1,7
Marcação em 34 a 66% do alvo	16	26,7
Marcação em 67 a 100% do alvo	43	71,7
Total	60	100,0

Tabela 45 - Frequências de imunomarcação específica UltraVision

4.5.2.4 Sistema Novolink

Finalmente, para o sistema UltraVision no mesmo parâmetro imunomarcação específica, obteve-se também uma moda da opção *Marcação em 67 a 100% do alvo* com 86,7% do total de respostas. As opções *0% de marcação do alvo* e *Marcação de 1 a 33% do alvo* não recolheram qualquer observação - Tabela 46.

Imunomarcação específica	Frequência	%
0% de marcação do alvo	0	0
Marcação de 1 a 33% do alvo	0	0
Marcação em 34 a 66% do alvo	8	13,3
Marcação em 67 a 100% do alvo	52	86,7
Total	60	100,0

Tabela 46 - Frequências de imunomarcação específica Novolink

4.5.3 Imunomarcação inespecífica

Na totalidade dos casos e para o parâmetro imunomarcação inespecífica, obteve-se uma moda da opção *Ausência de marcação de estruturas não-alvo* que recolheu 84,6% do total de respostas. A opção menos observada foi *Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo* com 0% das escolhas - Tabela 47.

Imunomarcação inespecífica	Frequência	%
Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo	0	0
Marcação em 34 a 66% de estruturas não-alvo	1	,4
Marcação de 1 a 33% de estruturas não-alvo	36	15,0
Ausência de marcação de estruturas não-alvo	203	84,6
Total	240	100,0

Tabela 47 - Frequências de imunomarcação inespecífica geral

4.5.3.1 Sistema EnVision+

Para os casos amplificados pelo sistema de polímero EnVision+ obteve-se uma moda da opção *Ausência de marcação de estruturas não-alvo* que recolheu 88,3% do total de respostas. As opções menos observadas foram *Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo* e *Marcação em 34 a 66% de estruturas não-alvo* com 0% das escolhas - Tabela 48.

Imunomarcação inespecífica	Frequência	%
Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo	0	0
Marcação em 34 a 66% de estruturas não-alvo	0	0
Marcação de 1 a 33% de estruturas não-alvo	7	11,7
Ausência de marcação de estruturas não-alvo	53	88,3
Total	60	100,0

Tabela 48 - Frequências de imunomarcação inespecífica EnVision+

4.5.3.2 Sistema ImmPRESS

Para o sistema ImmPRESS foi obtida uma moda da opção *Ausência de marcação de estruturas não-alvo* que recolheu 85% do total de respostas. As opções menos observadas foram *Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo* e *Marcação em 34 a 66% de estruturas não-alvo* com 0% das escolhas - Tabela 49.

Imunomarcação inespecífica	Frequência	%
Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo	0	0
Marcação em 34 a 66% de estruturas não-alvo	0	0
Marcação de 1 a 33% de estruturas não-alvo	9	15,0
Ausência de marcação de estruturas não-alvo	51	85,0
Total	60	100,0

Tabela 49 - Frequências de imunomarcação inespecífica ImmPRESS

4.5.3.3 Sistema UltraVision

No caso do sistema UltraVision foi obtida uma moda da opção *Ausência de marcação de estruturas não-alvo* que recolheu 78,3% do total de respostas. A opção com menos observações foi *Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo* com 0% das escolhas - Tabela 50.

Imunomarcação inespecífica	Frequência	%
Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo	0	0
Marcação em 34 a 66% de estruturas não-alvo	1	1,7
Marcação de 1 a 33% de estruturas não-alvo	12	20,0
Ausência de marcação de estruturas não-alvo	47	78,3
Total	60	100,0

Tabela 50 - Frequências de imunomarcação inespecífica UltraVision

4.5.3.4 Sistema Novolink

Finalmente, para o sistema NovoLink foi obtida uma moda da opção *nula* que recolheu 86,7% do total de respostas. As opções menos observadas foram *Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo* e *Marcação em 34 a 66% de estruturas não-alvo* com 0% das escolhas - Tabela 51.

Imunomarcação inespecífica	Frequência	%
Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo	0	0
Marcação em 34 a 66% de estruturas não-alvo	0	0
Marcação de 1 a 33% de estruturas não-alvo	8	13,3
Ausência de marcação de estruturas não-alvo	52	86,7
Total	60	100,0

Tabela 51 - Frequências de imunomarcação inespecífica Novolink

4.5.4 Intensidade da coloração de contraste

Na totalidade dos casos e para o parâmetro intensidade da coloração de contraste obteve-se uma moda da opção *muito forte* que recolheu 67,9% do total de respostas. As opções menos observadas foram *nula* e *fraca* com 0% das escolhas - Tabela 52.

Intensidade da coloração de contraste	Frequência	%
Nula	0	0
Fraca	0	0
Moderada	10	4,2
Forte	67	27,9
Muito forte	163	67,9
Total	240	100,0

Tabela 52 - Frequências de intensidade de coloração de contraste geral

4.5.4.1 Sistema EnVision+

Para o sistema EnVision+, no parâmetro intensidade da coloração de contraste, obteve-se uma moda da opção *muito forte* que recolheu 66,7% do total de respostas. As opções menos observadas foram *nula* e *fraca* com 0% das escolhas - Tabela 53.

Intensidade da coloração de contraste	Frequência	%
Nula	0	0
Fraca	0	0
Moderada	2	3,3
Forte	18	30,0
Muito forte	40	66,7
Total	60	100,0

Tabela 53 - Frequências de intensidade de coloração de contraste EnVision+

4.5.4.2 Sistema ImmPRESS

Para o sistema ImmPRESS, no parâmetro intensidade da coloração de contraste, obteve-se uma moda da opção *muito forte* que recolheu 68,3% do total de respostas. As opções menos observadas foram *nula* e *fraca* com 0% das escolhas - Tabela 54.

Intensidade da coloração de contraste	Frequência	%
Nula	0	0
Fraca	0	0
Moderada	1	1,7
Forte	18	30,0
Muito forte	41	68,3
Total	60	100,0

Tabela 54 - Frequências de intensidade de coloração de contraste ImmPRESS

4.5.4.3 Sistema UltraVision

No caso do sistema UltraVision, no parâmetro intensidade da coloração de contraste, obteve-se uma moda da opção *muito forte* que recolheu 63,3% do total de respostas. As opções menos observadas foram *nula* e *fraca* sem qualquer escolha - Tabela 55.

Intensidade da coloração de contraste	Frequência	%
Nula	0	0
Fraca	0	0
Moderada	4	6,7
Forte	18	30,0
Muito forte	38	63,3
Total	60	100,0

Tabela 55 - Frequências de intensidade de coloração de contraste UltraVision

4.5.4.4 Sistema Novolink

Finalmente, com o sistema Novolink, no parâmetro intensidade da coloração de contraste, obteve-se uma moda da opção *muito forte* que recolheu 73,3% do total de respostas. As opções menos observadas foram *nula* e *fraca* sem qualquer escolha - Tabela 56.

Intensidade da coloração de contraste	Frequência	%
Nula	0	0
Fraca	0	0
Moderada	3	5,0
Forte	13	21,7
Muito forte	44	73,3
Total	60	100,0

Tabela 56 - Frequências de intensidade de coloração de contraste Novolink

4.6 Variabilidade inter-observador

Os valores obtidos para os testes estatísticos de permitem avaliar a consistência interna da grelha de observação utilizada e a concordância dos avaliadores convidados foram: coeficiente Rho de Pearson $r=0,867$ ($p=,000$); Coeficiente de Correlação Intraclassa = 0,873 e Alfa de Cronbach = 0,927. Foi possível obter uma representação gráfica da comparação dos resultados obtidos dos 2 observadores - Figura 64.

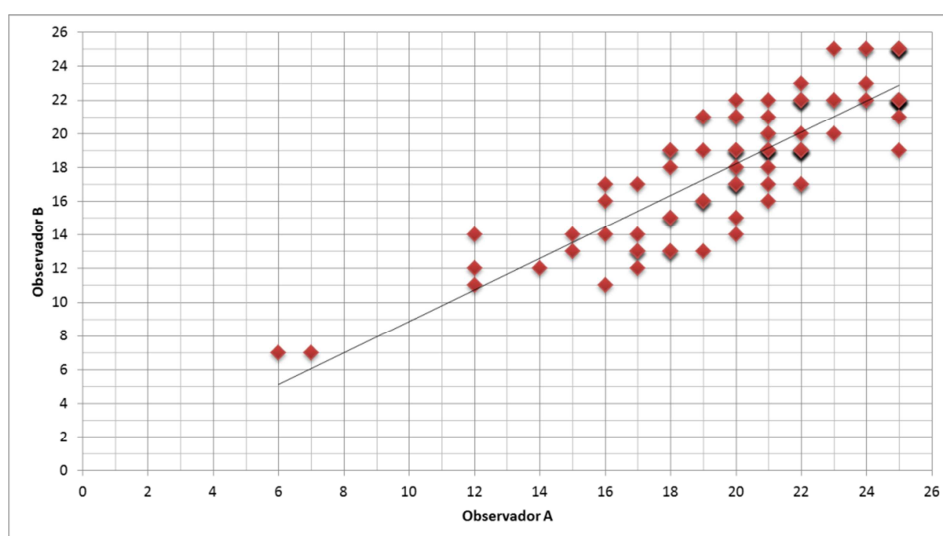


Figura 64 – Dispersão dos resultados dos avaliadores

5.1 Dos resultados dos antígenos de membrana celular

Para a imunomarcção de antígenos de membrana celular pode-se registrar que existem diferenças significativas em qualidade da marcação imunohistoquímica entre os quatro sistemas de detecção estudados, concluindo-se que os sistemas que melhor classificação obtêm são o NovoLink e UltraVision, surgindo depois o ImmPRESS e por fim o EnVision+.

5.2 Dos resultados dos antígenos de citoplasma

No caso dos marcadores de antígenos citoplasmáticos verifica-se que existem diferenças significativas em qualidade da marcação imunohistoquímica entre os quatro sistemas de detecção estudados, surgindo novamente o NovoLink com a melhor classificação. Os outros sistemas obtêm resultados inferiores sendo hierarquizados pela ordem: UltraVision, ImmPRESS e EnVision+, se bem que estes dois últimos não registem diferenças entre si, neste caso.

5.3 Dos resultados dos antígenos de núcleo

Não foram identificadas diferenças entre os sistemas estudados relativamente à imunomarcção dos antígenos nucleares, possivelmente devido ao baixo número de amostras agrupadas nos marcadores de antígenos nucleares.

5.4 Dos parâmetros da grelha de avaliação

Relativamente aos diferentes parâmetros que constituem o instrumento de avaliação, pode-se, mais uma vez, registrar uma tendência generalizada para o sistema NovoLink obter os resultados mais elevados, destacando-se na *intensidade* com cerca 92% dos seus resultados a obterem a classificação de *forte/muito forte*. No caso do item *marcação específica*, verifica-se que a esmagadora maioria dos casos obteve classificação de *Marcação em 67 a 100% do alvo*.

No lado exatamente oposto, temos o sistema EnVision+, que também aqui demonstra a sua tendência para obter os resultados mais baixos com somente 36,6 das suas classificações a passarem pelos itens *forte/muito forte*, no caso da *intensidade*. De destacar ainda o registo de dois casos em que foi obtida uma intensidade *nula*. Para o item *marcação específica*, apenas cerca de 2/3 dos casos classificam em *Marcação em 67 a 100% do alvo*.

O sistema ImmPRESS regista 45% dos seus resultados a cotarem nos valores *forte/muito forte* do item *intensidade*, destacando-se também a existência de dois casos com intensidade *nula*. Para o parâmetro *marcação específica* obteve-se um total de 93% dos casos com *Marcação em 34 a 66% do alvo* ou *Marcação em 67 a 100% do alvo*.

Os resultados do polímero UltraVision indicam a obtenção de 78% de resultados no campo do *forte/muito forte* para a *intensidade*, e 98% dos casos com *Marcação em 34 a 66% do alvo* ou *Marcação em 67 a 100% do alvo*.

Quando se analisam os parâmetros *marcação inespecífica* e *contraste* regista-se uma maior homogeneidade de resultados, que na sua globalidade, são bastante elevados. No entanto, é de destacar, pela negativa, os 22% de casos com marcação inespecífica registados pelo polímero UltraVision e, pela positiva, os 73% de casos com contraste *Muito forte* do sistema NovoLink.

5.5 Dos resultados globais

Este estudo mostra que existem diferenças significativas em qualidade da marcação imunohistoquímica entre os quatro sistemas de amplificação estudados, concluindo-se que o sistema de amplificação que melhor classificação obtém é o NovoLink, seguido do UltraVision, depois o ImmPRESS e por fim o EnVision+. O sistema NovoLink surge sistematicamente como aquele que apresenta resultados mais elevados e homogêneos em praticamente todos os parâmetros e para todos os antigénios.

Estas evidências sustentam uma generalização empírica que pode ser depreendida de trabalhos de base experimental, tal como o presente⁽¹⁰⁷⁾. Assim, com base neste dados, podemos concluir que, dos estudados, o sistema NovoLink é o mais adequado para aplicação laboratorial em imunohistoquímica.

Estas conclusões encontram concordância no estudo realizado por Skaland e seus colaboradores⁽²⁷⁾ que, ao comparar vários sistemas de amplificação em 12 soros de anticorpos diferentes, concluíram que o NovoLink apresentava resultados superiores ao UltraVision. Estes autores concluíram ainda que a utilização do sistema NovoLink poderia implicar o surgimento de imunomarcação inespecífica em algumas situações⁽²⁷⁾. No entanto, não foi considerada a contribuição que a diluição do soro primário pode ter para esta situação. Assim, tal como no presente estudo, poderiam ter sido benéfico verificar o comportamento do NovoLink numa técnica que recorre a diluições elevadas do soro primário, pois só assim poderiam excluir a associação entre a marcação inespecífica obtida e um soro primário demasiado concentrado.

Ao possibilitar a utilização de elevadas diluições dos anticorpos primários, o sistema NovoLink, além de baixar os custos finais da imunohistoquímica, de acordo com Sabatinni e colaboradores, garante ainda uma maior confiabilidade nos resultados, evitando fundo intersticial e citoplasmático, provocado por acumulações eletrostáticas ou outras reações não-imunológicas e não-específicas geradoras de reatividades cruzadas⁽¹⁷⁾.

Também Rocha e colaboradores⁽⁷⁹⁾ concluíram no seu estudo comparativo de sistema de amplificação, que o mesmo NovoLink mostrava resultados muito superiores ao sistema EnVision+ em termos de intensidade e sensibilidade, sem implicar aumento do fundo inespecífico. Tal como no presente estudo, Rocha e colaboradores tiveram o rigor metodológico de utilizar todos os sistemas estudados de acordo com as recomendações dos fabricantes, pois só assim se torna possível apreciar todas as potencialidades dos sistemas em ação.

Os polímeros de 3 passos analisados neste estudo (NovoLink e UltraVision) permitiram melhores resultados, o que corrobora a teorização de Petrosyan e colaboradores ⁽¹⁸⁾ sobre a importância da dimensão e estrutura tridimensional dos polímeros na acessibilidade a anticorpos primários que possam estar mais inalcançáveis nos tecidos.

Também se verifica que os sistemas baseados em micropolímeros de enzimas (NovoLink, UltraVision e ImmPRESS) obtêm, consistentemente, melhores resultados. Esta conclusão vai ao encontro das conclusões de Shi e colaboradores ⁽⁷⁸⁾ e de Ramos-Vara e Miller ⁽⁸¹⁾. Estes últimos, também determinaram que o sistema ImmPRESS era mais amplificador do que o EnVision+, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo, e reforça novamente a importância de recorrer a sistema de micropolímeros em detrimento dos sistemas de esqueleto interno.

Outro elemento a referir na nossa reflexão é o contraste (hematoxilina), destacando-se que o sistema que obtém a melhor classificação é exatamente aquele que fornece o seu próprio contraste. A tonalidade de azul obtida por aplicação das variadas hematoxilinas não é uniforme, surgindo corantes, como a variação de Mayer, que permitem um azul celeste e outros, como a variação de Harris, que conferem uma tonalidade mais acinzentada - Figura 65.

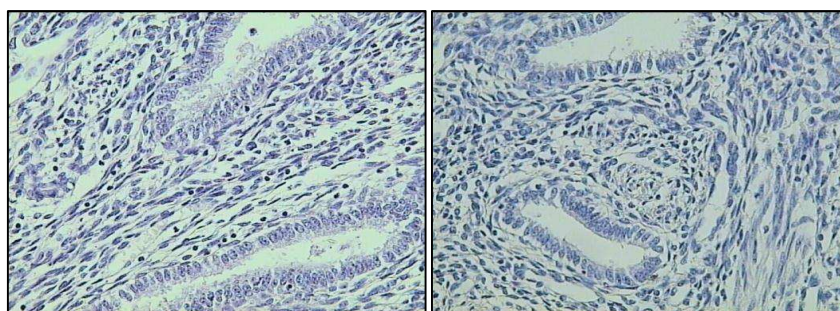


Figura 65 – Contrastes pela hematoxilina de Harris (esquerda) e hematoxilina de Mayer (direita)

A variação comercializada no *kit* do sistema NovoLink aposta claramente num azul claro/celeste que parece destacar o castanho/bronze brilhante dos produtos finais da precipitação da 3'3-DAB. Esta opção do fabricante Leica em constituir um *kit* completo que reúne praticamente todos os reagentes necessários à realização da imunomarcção parece assim ser uma mais-valia, pois sintoniza a totalidade dos reagentes utilizados, simplificando a técnica e criando um resultado final mais uniforme, reprodutível e homogéneo - Figura 66.

Apesar das diferenças detetadas é de salientar que, numa abordagem geral, podemos verificar que todos os sistemas permitiram resultados acima do ponto médio da escala de avaliação utilizada. No entanto, o mais importante a assinalar será o facto dos sistemas EnVision+ e ImmPRESS terem registado duas situações de resultados falsos negativos, que no caso de acontecerem em ambiente hospitalar poderiam comprometer o diagnóstico anátomo-patológico.

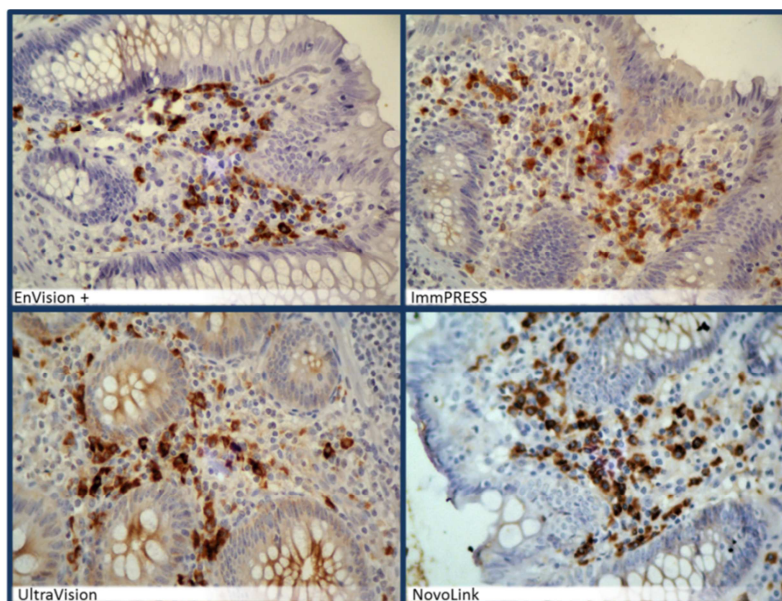


Figura 66 – Imunomarcção para cadeias leves Kappa – ampliação 400x

5.6 Da variabilidade inter-observador

Todos os indicadores de avaliação da variabilidade inter-observador são bastante elevados e parecem corroborar a alta consistência e qualidade da grelha de avaliação e o elevado grau de concordância existente entre os avaliadores. Podemos assim concluir que esta é uma medida reprodutível pois provém de um procedimento reprodutível ou seja se repetido nas mesmas condições obtém, tendencialmente, as mesmas medidas.

Allsbrook e colaboradores obtiveram valores de coeficientes k de 0,56 a 0,70, quando compararam a avaliação de biópsias prostáticas realizada por patologistas urológicos, o que é uma concordância substancialmente inferior à que foi identificada neste estudo. Esses valores podem ser explicados pela elevada complexidade da metodologia utilizada por aqueles autores (classificação de Gleason)⁽¹⁰⁸⁾. Também Nunes e colaboradores obtiveram níveis de concordância moderada entre observadores quando estudaram a imunomarcção de HER2 para cinco anticorpos diferentes, sendo que a experiência dos observadores influenciou as taxas de concordância⁽¹⁰⁹⁾. Apesar destes estudos terem abordado fenómenos ligeiramente diferentes dos referidos no presente trabalho, reforça-se a ideia de qualidade da grelha utilizada.

5.7 Limitações e sugestões

De acordo com Alves e colaboradores⁽²⁶⁾, o tempo de fixação das amostras pode ser relevante para a qualidade da reação. Esta constatação levou-nos a definir que uma das limitações surgidas neste trabalho se prendeu com a impossibilidade de controlo do tempo de fixação das amostras. Sugere-se assim a realização de estudos prospetivos que incluam um controlo das etapas de fixação e processamento.

Outra limitação está relacionada com a quantidade relativamente baixa de soros primários utilizados, pelo que se sugere a replicação do estudo aplicando um painel mais vasto dos referidos reagentes. Além disso também parece apropriado, num ensaio futuro, uma vez que no presente estudo só foram utilizados soros monoclonais obtidos em ratinho, verificar o comportamento destes sistemas de amplificação quando associados a soros obtidos noutras espécies animais e tentar comprovar as diferenças de resultados obtidas em função da origem do anticorpo primário por Skaland e colaboradores⁽²⁷⁾.

Tendo em conta que o sistema de polímero que melhores resultados obtém neste estudo é o único que apresenta o seu próprio contraste, sugere-se também uma exploração mais profunda do impacto que a qualidade do contraste tem na qualidade global da imunohistoquímica.

Tendo em conta que o reduzido número de antigénios nucleares avaliados neste estudo poderá ser muito relevante apreciar, numa próxima investigação, o comportamento destes elementos relativamente à imunomarcação promovida pelos sistemas de polímeros.

Poderia ser também interessante fazer uma comparação entre os sistemas de polímero e algumas das abordagens baseadas na amplificação de sinal por deposição de tiramina⁽¹¹⁰⁾, imunorreação em cadeia da polimerase (111) - Figura 67 - e técnicas de amplificação do produto final⁽¹¹²⁾ que reportam um aumento da deteção, que, no entanto, parece ser acompanhada por marcação inespecífica e protocolos demasiado complexos.

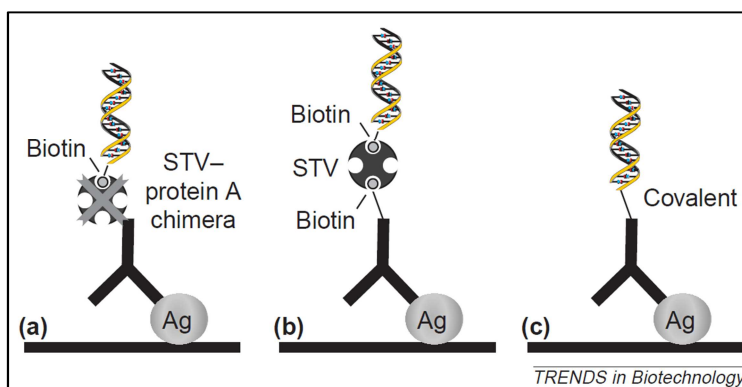


Figura 67 - representação esquemática das aplicações práticas da imuno-PCR

Fonte: <http://cmbi.bjmu.cn/news/report/2004/biotech/43.pdf>

O instrumento de recolha de dados utilizado neste estudo poderá ser utilizado ou até mesmo validado em trabalhos futuros por forma a confirmar a qualidade que obteve neste trabalho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Polak, J e Noorden, S. *Introduction to Immunocytochemistry*. 3ª. Londres : BIOS Scientific Publishers, 2003.
2. Dako. *Immunohistochemical staining methods*. [ed.] G Kumar e L Rudbeck. 5ª Edição. Carpinteria : Dako, 2009.
3. Werner, M, Von Wasielewski, R e Komminoth, P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*. 1996, Vol. 105, pp. 253-260.
4. Werner, M. Tissue fixation and antigen retrieval. *Rev Esp Patol*. 3, 1999, Vol. 32, pp. 355-361.
5. Werner, M, et al. Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on Immunohistochemistry. *American Journal of Surgical Pathology*. 2000, Vol. 24, 7, pp. 1016-1019.
6. Ramos-Vara, J. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005, Vol. 42, pp. 405-426.
7. Coons, A, Creech, H e Jones, R. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1941, Vol. 47, pp. 200–202.
8. Key, M. *Immunohistochemical staining methods*. 4ª. EUA : Dako Corporation, 2006.
9. Sternberger, L, et al. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem*. 1970, Vol. 18, pp. 315-333.
10. Scopsi, L e Larsson, L. Increased sensitivity in peroxidase immunocytochemistry. *Histochemistry*. 1986, Vol. 84, pp. 221-230.
11. Guesdon, J, Ternynck, T e Avrameas, S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem*. 1979, Vol. 27, pp. 1131–1139.
12. von Wasielewski, R, et al. Tyramine Amplification Technique in Routine Immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1997, Vol. Volume 45(11), pp. 1455–1459.
13. Vyberg, M e Nielsen, S. Dextran polymer conjugate two-step visualization system for immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem*. 1998, Vol. 6, pp. 3–10.
14. Heras, A, Roach, C e Key, M. Enhanced polymer detection system for immunohistochemistry. *Mod. Pathol*. 1995, Vol. 8, p. 165A.
15. Vosse, B, et al. Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the Avidin-Biotin Complex system and the EnVision+ system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. Março de 2007, Vol. 15, 1, pp. 103-7.
16. Wong, S, et al. The Contribution of Bifunctional SkipDewax Pretreatment Solution, Rabbit Monoclonal Antibodies, and Polymer Detection Systems in Immunohistochemistry. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. July de 2007, Vol. 131, 7, pp. 1047-1055.
17. Sabbatini, E, et al. The EnVision System: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *Journal of Clinical Pathology*. 1998, Vol. 51, pp. 506-511.
18. Petrosyan, K, Tamayo, R e Joseph, D. Sensitivity of a novel Biotin-free detection reagent (PowerVision+) for immunohistochemistry. *Journal of Histotechnology*. 2002, Vol. 25, pp. 247-250.
19. Kämmerer, U, et al. A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001, Vol. Volume 49(5), pp. 623–630.

20. Wiedorn, K, et al. EnVision+, a New Dextran Polymer-based Signal Enhancement Technique for In Situ Hybridization (ISH). *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001, Vol. Volume 49(9), pp. 1067–1071.
21. Sigma-Aldrich Co. LLC. Dextran. [Online] 2011. [Citação: 1 de Novembro de 2011.] <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=22696471>.
22. Dako. EnVision™+ Kits. [Online] 2010. [Citação: 10 de Dezembro de 2010.] http://www.dako.com/dist/ar38/p107050/prod_products.htm.
23. Vector laboratories. ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit. [Online] 2010. [Citação: 10 de Dezembro de 2010.] <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?prodID=1629>.
24. Novocastra Laboratories Ltd. *Instructions for Use NovoLink™ Polymer Detection System*. [Documento eletrônico] Newcastle Upon Tyne: s.n., 2006. http://www.leica-microsystems.com/fileadmin/img_uploads/novocastra_reagents/Novocastra_datasheets/re7200-ce.pdf.
25. Thermo Scientific. UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen . [Online] 2009. [Citação: 10 de Dezembro de 2010.] <http://www.labvision.com/lv.cfm?first=Reagent&second=UltraVision%20LP%20Detection%20System%20HRP%20Polymer%20%26%20DAB%20Plus%20Chromogen>.
26. Alves, V, et al. Controle de qualidade interlaboratorial em imuno-histoquímica: citoqueratinas e receptor de estrógeno como modelos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2004, Vol. 40 (3).
27. Skaland, I, et al. Evaluation of 5 different labeled polymer immunohistochemical detection systems. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010, Vol. 18(1), pp. 90-6.
28. Leica Microsystems. Novocastra Manual Detection Systems. [Online] 2002. [Citação: 10 de Dezembro de 2010.] <http://www.leica-microsystems.com/products/total-histology/novocastra-reagents/detection-systems-buffers/>.
29. Santaella, L. *Comunicação e Pesquisa*. S. Paulo : Hacker, 2006. ISBN: 8586179299.
30. Nakane, P e Pierce, G. Enzyme-labeled antibodies: preparation and localization of antigens. *J Histochem Cytochem*. 1966, Vol. 14, pp. 929–931.
31. Mason, D e Sammons, R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol*. 1978, Vol. 31, pp. 454–460.
32. Carson, F e Hladik, C. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. 3ª Edição. s.l. : American Society for Clinical Pathology, 2009. ISBN: 9780891895817.
33. Singer, S e Schick, F. The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin. *J. Cell Biol*. 1961, Vol. 9, p. 519.
34. Faulk, W e Taylor, G. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*. 1971, Vol. 8, 11, pp. 1081-1083.
35. Delves, P, et al. *Roitt's Essential Immunology*. 12ª Edição. New York : Wiley-Blackwell, 2011. ISBN: 978-1-4051-9683-3.
36. Hay, F e Westwood, O. *Practical Immunology*. 4ª Edição. New York : Wiley-Blackwell, 2002. ISBN: 978-0-86542-961-1.
37. Mak, T e Saunders, M. *Primer to the Immune Response*. Update Edition. New York : Elsevier, 2011.

38. Copstead, L e Banasik, J. *Pathophysiology*. 4ª Edição. New York : Saunders, 2009. ISBN: 978-1416055433.
39. Bloch, D. *Organic Chemistry*. Nova Iorque : McGraw- Hill, 2001. 0071487107.
40. Brumbaugh, K, et al. Overview of the Generation, Validation, and Application of Phosphosite-Specific Antibodies. [autor do livro] A Kalyuzhny. *Signal Transduction Immunohistochemistry*. New York : Humana Press, 2011.
41. Nobelprize.org. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984. [Online] [Citação: 10 de Dezembro de 2011.] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/presentation-speech.html.
42. Bancroft, J e Gamble, M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6ª. Londres : Churchill Livingstone, 2007.
43. Shi, S e Taylor, C. *Antigen Retrieval Immunohistochemistry Based Research and Diagnostics*. New Jersey : John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 978-0-470-62452-4.
44. National Toxicology Program. Report on Carcinogens. [Online] Department of Health and Human Services, Junho de 2011. [Citação: 1 de Dezembro de 2011.] <http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc12..>
45. Shi, SR, et al. Calcium-induced Modification of Protein Conformation Demonstrated by Immunohistochemistry: What Is the Signal? *J Histochem Cytochem*. 1999, Vol. 47, pp. 463-469.
46. Shi, S, Key, M e Kalra, K. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. Junho de 1991, Vol. 39, pp. 741-8.
47. Dabbs, D. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 2ª ed. New York : Elsevier, 2006.
48. Battifora, H, et al. Epitope Retrieval (unmasking) in Immunohistochemistry. *Advances in Pathology and Laboratory Medicine*. 1995, Vol. 8, pp. 101-118.
49. Burns, J, Hambridge, M e Taylor, C. Intracellular immunoglobulins. *J Clin Path*. 1974, Vol. 27, pp. 548-557.
50. Shi, S, Cote, R e Taylor, C. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *J Histochem Cytochem*. Março de 1997, Vol. 45, pp. 327-343.
51. Hayat, M. *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods: For Light and Electron Microscopy*. New York : Springer, 2002. ISBN: 0306467704.
52. Huang, S. Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Laboratory Investigation: a Journal of Technical Methods and Pathology*. 1975, Vol. 33, 1, pp. 88-95.
53. Shi, S, Cote, R e Taylor, C. Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives. *J. Histochemistry & Cytochemistry*. 2001, Vol. 49, pp. 931-937.
54. Fraenkel-Conrat, H, Cooper, M e Olcott, H. The Reaction of Formaldehyde with Proteins. *Journal of the American Chemical Society*. 1945, Vol. 67, 6, pp. 950-954.
55. Leong, A, Milios, J e Leong, F. Epitope retrieval with microwaves. A comparison of citrate buffer and EDTA with three commercial retrieval solutions. *Appl Immunohistochem*. 1996, Vol. 4, pp. 201-207.
56. Kawai, K, et al. Heat induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol Int*. 1994, Vol. 44, pp. 759-764.
57. Cattoretto, G, et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J. Pathol*. 1993, Vol. 171, pp. 83-98.

58. Shi, S, et al. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem*. Fevereiro de 1995, Vol. 43, pp. 193-201.
59. Morgan, J, et al. Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval. *J Pathol*. 1994, Vol. 174, pp. 301–307.
60. Morgan, J, Navabi, H e Jasani, B. Role of calcium chelation in high-temperature antigen retrieval at different pH values. *J Pathol*. 1997, Vol. 182, pp. 233–237.
61. Bankfalvi, A, et al. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J. Pathol*. 1994, Vol. 174, pp. 223-228.
62. Igarashi, H, et al. Alteration of immunoreactivity by hydrated autoclaving, microwave treatment, and simple heating of paraffin-embedded tissue sections. *APMIS*. 1994, Vol. 102, pp. 295-307.
63. Umemura, S, et al. Antigen retrieval for bcl-2 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol Int*. 1994, Vol. 45, pp. 103-107.
64. Pons, C, et al. Antigen retrieval by wet autoclaving for p53 immunostaining. *Appl Immunohistochem*. 1995, Vol. 3, pp. 265-267.
65. Norton, A, Jordan, S e Yeomans, P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol*. 1994, Vol. 173, pp. 371-379.
66. Miller, R e Estran, C. Heat-induced epitope retrieval with a pressure cooker - suggestions for optimal use. *Appl Immunohistochem*. Vol. 3, pp. 190-193.
67. Pasha, T, Montone, K e Tomaszewski, J. Nuclear antigen retrieval utilizing steam heat. *Lab Invest*. 1995, Vol. 72, p. 167.
68. Taylor, C, et al. comparative study of antigen retrieval heating methods. *CAP Today*. 1995, Vol. 9, pp. 16-22.
69. Kenny-Moynihan, M e Unger, E. Immunohistochemical and In Situ Hybridization Techniques. [autor do livro] T O'Leary. *Advanced Diagnostic Methods in Pathology*. London : Saunders, 2003, 2, pp. 95-122.
70. Mogharrab, N, Ghourchian, H e Amininasab, M. Structural Stabilization and Functional Improvement of Horseradish Peroxidase upon Modification of Accessible Lysines: Experiments and Simulation. *Biophys J*. 15 de Fevereiro de 2007, Vol. 92, 4, pp. 1192–1203.
71. Katchalski, E, et al. *Polymeric enzyme products*. 3650901 USA, 21 de Março de 1972.
72. Winther, L, et al. *Methods and Compositions for Immuno-Histochemical Detection*. US 2005/0208529 A1 USA, 22 de Setembro de 2005.
73. Winther, L, et al. *Immunohistochemistry Detection Method*. US 2011/0177500 A1 USA, 21 de Julho de 2011.
74. Coleman, W e Tsongalis, G. *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. 2ª Edição. New York : Humana Press, 2010. ISBN: 1588293564.
75. Bricca, G, Brodland, D e Zitelli, J. Immunostaining melanoma frozen sections: the 1-hour protocol. *Dermatol Surg*. 2004, Vol. 30, p. 403.
76. Abir, F, Barkhordarian, S e Sumpio, B. Efficacy of dextran solutions in vascular surgery. *Vasc Endovascular Surg*. 2004, Vol. 38, 6, pp. 483-91.
77. Zevenhuizen, L. Cell-bound exo-dextranase of Bacillus species. *Carbohydr Res*. 1968, Vol. 6, pp. 310-318.

78. Shi, S, et al. Sensitivity and Detection Efficiency of a Novel Two-Step Detection System (PowerVision) for Immunohistochemistry. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. Set de 1999, Vol. 7, 3, p. 201.
79. Rocha, R, et al. The Use of the Immunohistochemical Biotin-Free Visualization Systems for Estrogen Receptor Evaluation of Breast Cancer. *Applied Cancer Research [Online]*. 4 de Nov de 2009, Vol. 29, 3.
80. Pardal, L e Correia, E. *Métodos e técnicas de investigação social*. Porto : Areal Editores, 1995.
81. Ramos-Vara, JA e Miller, MA. Comparison of two polymer-based immunohistochemical detection systems: ENVISION+ and ImmPRESS. *J Microsc*. Novembro de 2006, Vol. 224(Pt 2), pp. 135-9.
82. Fortin, M. *Fundamentos e etapas do processo de investigação*. Loures : Lusodidacta, 2009. 978-989-8075-18-5.
83. Grawitz, M. *Methodes des sciences sociales*. 9ª. Paris : Dalloz, 1993.
84. Abramson, J. *Survey methods in community medicine epidemiological studies program evaluation clinical trials*. 4ª. London : Churchill Livingstone, 1998.
85. Bryman, A e Cramer, D. *A Análise dos dados em ciências sociais*. 3ª. Oeiras : Celta Editora, 2003.
86. Dako. EnVision+ System-HRP (DAB). *Manual de instruções*. EUA : Dako, SD.
87. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Reprodutibilidade e validade de medidas. *Med Stat Web*. [Online] 2000. [Citação: 22 de Novembro de 2011.] [http://medstatweb.med.up.pt/cursop/main.php3?capitulo=reprodutibilidade&numero=1&titulo=rep rodutibilidade](http://medstatweb.med.up.pt/cursop/main.php3?capitulo=reprodutibilidade&numero=1&titulo=rep%20rodutibilidade).
88. Sahin, A e Ordonez, N. Quantitative estrogen receptor immunohistochemical analysis of breast cancer: advantages and potential problems. *Adv Anat Pathol*. 1996, Vol. 3, pp. 97-100.
89. Dunstan, R, et al. The Use of Immunohistochemistry for Biomarker Assessment—Can It Compete with Other Technologies? *Toxicol Pathol*. 39, 2011, Vol. 6, pp. 988-1002.
90. Barnes, D, et al. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *British Journal of Cancer*. 1996, Vol. 74, pp. 1445-1451.
91. Allred, D, et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998, Vol. 2, pp. 155-168.
92. Seidal, T, Balaton, A e Battifora, H. Interpretation and Quantification of Immunostains. *The American Journal of Surgical Pathology*. Setembro de 2001, Vol. 25, pp. 1204-1207.
93. Leake, R. Detection of the oestrogen receptor (ER): immunohistochemical versus cytosol measurements. *Eur J Cancer*. Setembro de 2000, Vol. 36 Suppl 4:S, pp. 18-9.
94. Harvey, J, et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligandbinding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999, Vol. 17, pp. 1474-81.
95. Almeida Filho, N e Rouquayrol, M. *Introdução à epidemiologia moderna*. 2ª ed. Belo Horizonte : COOPMED-APCE-ABRASCO, 1992.
96. Junqueira, L e Carneiro, J. *Histologia Básica*. 11ª Ed. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 2008. ISBN: 9788527714020.
97. Hill, M e Hill, A. *Investigação por questionário*. Lisboa : Sílabo, 2000.
98. Maroco, J. *Análise Estatística*. 3ª Edição. Lisboa : Edições Sílabo, 2007. ISBN 978-972-618-452-2.

99. Brace, N, Kemp, R e Snelgar, R. *SPSS for Psychologists*. London : Mcmillan Press, 2000.
100. Landis, J e Koch, G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977, Vol. 33, pp. 159-174.
101. George, D e Mallery, P. *SPSS for Windows step by step: A simple guide and reference*. 4ª Edição. Boston : Allyn & Bacon, 2003.
102. Rowe, A, et al. Design effects and intraclass correlation coefficients from a health facility cluster survey in Benin. *Int J Qual Health Care*. 2002, Vol. 14, pp. 521-523.
103. Maroco, J e Garcia-Marques, T. Qual a fiabilidade do alfa de Cronbach? Questões antigas e soluções modernas? *Laboratório de Psicologia*. 2006, Vol. 4, 1, pp. 65-90.
104. International Organization for Standardization. *Norma internacional ISO 690-2:1997*. 1997.
105. Chapeau, W. *Manual de Emergências - Um Guia para Primeiros Socorros*. Rio de Janeiro : Elsevier, 2008.
106. Delgado, M. A gestão dos Riscos nos Hospitais. [Online] 2005. [Citação: 2 de Março de 2011.] http://www.hospitalsepe.min-saude.pt/NR/rdonlyres/FDFBFE54-74DE-42C8-BC7F-733BE758D96D/4086/08de14_Apresent_RiscoHospitalar_ManuelDelgado_APAH.pdf.
107. Thiry-Cherques, H. A validade da generalização. *Cadernos EBAPE.BR*. Dezembro de 2009, Vol. 7, 4.
108. Allsbrook, W, Mangold, K e Johnson, M. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: General pathologists. *Hum Pathol*. 2001, Vol. 32, pp. 81-88.
109. Nunes, C, et al. Concordância interobservador na interpretação imuno-histoquímica da superexpressão do Her2 detectada por cinco diferentes anticorpos em array de carcinomas mamários. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2007, Vol. 43, 5, pp. 373-379.
110. Kim, S, et al. An Improved Protocol of Biotinylated Tyramine-based Immunohistochemistry Minimizing Nonspecific Background Staining. *J Histochem Cytochem*. 2003, Vol. 51, pp. 129-132.
111. Niemeyer, C, Adler, M e Wacker, R. Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acids amplification. *TRENDS in Biotechnology*. Abril de 2005, Vol. 23, 4, pp. 208-216.
112. Chen, B, et al. A strategy for immunohistochemical signal enhancement by end-product amplification. *J Histochem Cytochem*. 1996, Vol. 44, 8, pp. 819-824.
113. Norton, A. Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections. *J. Pathol*. 1993, Vol. 171, pp. 79-80.
114. Rocha, R, et al. Biotin-free systems provide stronger immunohistochemical signal in oestrogen receptor evaluation of breast cancer. *J Clin Pathol*. 2009, Vol. 62, pp. 699-704.
115. Pileri, S, Serra, L e Martinelli, G. The use of pronase enhances sensitivity of the PAP method in the detection of intracytoplasmic immunoglobulins. *Basic Appl. Histochem*. 1980, Vol. 24, 3, pp. 203-207.
116. Smoerum, L, et al. *METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMMUNO-HISTOCHEMICAL DETECTION*. US 2005/0208529 01 USA, 22 de Setembro de 2005.
117. Pereira, A. *Guia prático de utilização do SPSS - Análise de Dados para Ciências Sociais e Psicologia*. Lisboa : Edições Sílabo, 2008. 97 -972- 618-510-9.

7.1 Apêndice 1 - Tampão EDTA 1 mM pH 8.0

Preparação da Solução Stock 100x concentrada.

1. Juntar 29,2 g de EDTA a 1000 cm³ de água Destilada.
2. Ajustar o pH com NaOH 0,1M para ajudar a dissolução.

Notas:

- a. A solução *stock* deve ser diluída a 1/100 antes da utilização e ajustar o pH com NaOH 0.1M, adicionado muito lentamente.

7.2 Apêndice 2 - Tampão citrato, pH 6.0

Para 5000 cm³ de solução:

1. Juntar 10.5g de Ácido Cítrico a 5000 cm³ de água destilada.
2. Acertar o pH a 6.0 com NaOH 2M (aproximadamente 60 cm³).

7.3 Apêndice 3 - Tampão Tris/EDTA, pH9.0

1. Juntar 1000 cm³ de água destilada a 1,21 g de Tris Base e a 0,37 g de EDTA.
2. Acertar o pH a 9.0, com NaOH 0,1M.

7.4 Apêndice 4 – Instrumento de recolha de dados

Grelha de classificação de imunomarcação

Observador: _____

Por favor utilize a seguinte escala para classificar as lâminas histológicas em termos de imunomarcação:

Intensidade de imunomarcação

Valor	Características	Operacionalização
0	Marcação nula	---
1	Marcação de fraca intensidade	Visível somente em muito grande ampliação – 400x
2	Marcação de moderada intensidade	Visível somente em grande ampliação – 100x
3	Marcação de forte intensidade	Visível em baixa ampliação - 40x
4	Marcação de muito forte intensidade	Nitidamente visível em baixa ampliação – 40x

Imunomarcação específica

Valor	Características	Operacionalização
0	0% de marcação do alvo	---
1	Marcação de 1 a 33% do alvo	Estimativa de marcação de 1 em 3 estruturas alvo
2	Marcação em 34 a 66% do alvo	Estimativa de marcação de 2 em 3 estruturas alvo
3	Marcação em 67 a 100% do alvo	Estimativa de marcação de 3 em 3 estruturas alvo

Imunomarcação não específica

Valor	Características	Operacionalização
0	Marcação em 67 a 100% de estruturas não-alvo	Estimativa de marcação de 3 em 3 estruturas não-alvo
1	Marcação em 34 a 66% de estruturas não-alvo	Estimativa de marcação de 2 em 3 estruturas não-alvo
2	Marcação de 1 a 33% de estruturas não-alvo	Estimativa de marcação de 1 em 3 estruturas não-alvo
3	Ausência de marcação de estruturas não-alvo	---

Intensidade da coloração de contraste

Valor	Características	Operacionalização
0	Ausência de coloração	---
1	Coloração de fraca intensidade	Visível somente em muito grande ampliação – 400x
2	Coloração de moderada intensidade	Visível somente em grande ampliação – 100x
3	Coloração de forte intensidade	Visível em baixa ampliação - 40x
4	Coloração de muito forte intensidade	Nitidamente visível em baixa ampliação – 40x

Nº	Intensidade de imunomarcção	Imunomarcção específica	Imunomarcção não específica	Intensidade da coloração de contraste	Observações
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					

Nº	Intensidade de imunomarcção	Imunomarcção específica	Imunomarcção não específica	Intensidade da coloração de contraste	Observações
47					
48					
49					
50					
51					
52					
53					
54					
55					
56					
57					
58					
59					
60					
61					
62					
63					
64					
65					
66					
67					
68					
69					
70					
71					
72					
73					
74					
75					
76					
77					
78					
79					
80					
81					
82					
83					
84					
85					
86					
87					
88					
89					
90					
91					

Nº	Intensidade de imunomarcção	Imunomarcção específica	Imunomarcção não específica	Intensidade da coloração de contraste	Observações
92					
93					
94					
95					
96					
97					
98					
99					
100					
101					
102					
103					
104					
105					
106					
107					
108					
109					
110					
111					
112					
113					
114					
115					
116					
117					
118					
119					
120					

7.5 Apêndice 5 - Protocolo da técnica imunohistoquímica

1. **Desparafinar** em Xilol – 10 min.
2. **Hidratar**.
3. **Recuperação Antigênica** com solução de EDTA 1mM (pH 8.0) em micro-ondas a 700w – 15 min.
4. Arrefecer gradualmente em água corrente.
5. Lavagem em PBS.
6. **Bloqueio da Peroxidase Endógena** com o reagente de bloqueio de cada um dos sistemas -5 min.
7. Lavagem em PBS.
8. **Bloqueio Proteico** de acordo com os reagentes presentes no ImmPRESS, NovoLink e UltraVision. Não foi efetuado este passo no Envision+, uma vez que não é recomendado pelo fabricante.
9. **Soro Primário**, utilizando as diluições de trabalho já referidas – 30 min.
10. Lavagem em PBS.
11. **Ativador**. Os Sistemas NovoLink e UltraVision incluem uma solução com esta denominação que é aplicada durante 30 min e 20 min, respetivamente.
12. Lavagem em PBS.
13. **Polímero** – 30 min.
14. Lavagem em PBS.
15. **Cromogénio**. 3'3-DAB de cada um dos Sistemas – 5 min.
16. Lavagem em água corrente.
17. **Contraste**. Utilizou-se Hematoxilina de Mayer para todos os testes, exceto para o NovoLink, que possui a sua própria Hematoxilina.
18. Lavagem em água corrente para azular.
19. **Desidratar e montar**.

Code K4007

The following materials, sufficient for 1100 tissue sections, based upon 100 µL per section, are included in this kit:

Quantity	Description
1x110 mL	Peroxidase Block PEROXIDASE BLOCK 0.03% hydrogen peroxide containing sodium azide.
1x110 mL	Labelled Polymer LABELLED POLYMER-HRP ANTI-MOUSE Peroxidase labelled polymer conjugated to goat anti-mouse immunoglobulins in Tris-HCl buffer containing stabilizing protein and an anti-microbial agent.
1x120 mL	Buffered Substrate DAB+ SUBSTRATE BUFFER Substrate Buffer solution, pH 7.5, containing hydrogen peroxide and a preservative.
1x5 mL	DAB+ Chromogen DAB+ CHROMOGEN 3,3'-diaminobenzidine chromogen solution.
Accessories	
1	Calibrated test tube
1	Plastic Pasteur pipette

Materials required, but not supplied

Absorbent wipes
Control tissue, positive and negative
Counterstain; aqueous based, such as Mayer's Hematoxylin or Lillie's Modified Mayer's Hematoxylin (code S3309)
Coverslips
Distilled water
Ethanol, absolute and 95%
Light microscope (20x–800x)
Mounting media, such as Glycergel® Mounting Medium (code C0563) or Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-use (code S3025) or nonaqueous permanent mounting medium, Ultramount (code S1964)
Primary antibodies and negative control reagent
Slides, Poly-L-lysine coated or Silanized Slides (code S3003)
Staining jars or baths
Timer (capable of 3-40 minute intervals)
Wash bottles
Wash Buffer Solution
Xylene, toluene or xylene substitutes

Optional materials required, but not supplied

Ammonium hydroxide, 15 mol/L diluted to 0.037 mol/L
PAP Pen (code S2002)

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, build-ups of NaN₃ may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal oxides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build-up in plumbing.^{1,2}
3. Do not use reagents beyond expiration date for prescribed storage method. If reagents are stored under any conditions other than those specified in the product insert, they must be validated by the user.
4. Do not substitute reagents from other lot numbers or from kits of other manufacturers.
5. Enzymes and substrate-chromogens may be affected adversely if exposed to excessive light levels. Do not store kit components or perform staining in strong light, such as direct sunlight.
6. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results; any such changes must be validated by the user.
7. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
8. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
9. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
10. Material Safety Data Sheets available for professional users upon request.

Risk and Safety statements**K4006 & K4007 Peroxidase Block**

R22 Harmful if swallowed.

K4006 & K4007 DAB Chromogen

R40 Limited evidence of a carcinogenic effect.

R43 May cause sensitization by skin contact.

R68 Possible risk of irreversible effects.

S35 This material and its container must be disposed of in a safe way.

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

Storage

Reagents of the Dako EnVision+ System, HRP are to be stored at 2–8°C. Do not freeze. Do not use after expiration printed on reagent vials and kit label.

Alteration in the appearance of any reagent, such as precipitation, may indicate instability or deterioration. In such cases, the reagent(s) is (are) not to be used.

There are no obvious signs to indicate instability of these products. Therefore, positive and negative controls should be tested simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variation in laboratory procedures and a problem with the kit is suspected, contact Dako Technical Support.

Reagent preparation

It is convenient to prepare the following reagents prior to staining.

Wash Buffer Solution

TBST, 0.05 mol/L Tris Buffered Saline with Tween (code S3006) is the recommended wash buffer for automated and manual IHC detection. TBS, 0.05 mol/L Tris Buffered Saline (code S1968) and PBS, 0.02 mol/L Phosphate Buffered Saline (code S3024) are also suitable wash buffer solutions for manual staining. Wash buffer solutions containing sodium azide are not recommended. Sodium azide will inactivate horseradish peroxidase (HRP) resulting in negative staining. Store unused buffer at 2–8°C. Discard buffer if cloudy in appearance.

Distilled water may be used for rinsing the peroxidase block, substrate and counterstain.

Primary Antibody

Concentrated antibodies are available from Dako; however, optimal dilutions must be determined experimentally by the user. Due to the high sensitivity of the Dako EnVision+ System, HRP, primary antibody dilutions may range from five- to twenty-fold greater than those used in traditional IHC methods. Dilutions should be prepared using 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.2–7.6, containing 1% bovine serum albumin (Antibody Diluent, code S0809). For most primary antibodies used with this kit, an incubation time of 30 minutes is sufficient.

NP-Series "Plus" ready-to-use antibodies are optimized and recommended for use with Dako "Plus" high-sensitivity detection systems. Concentrated antibodies are also available from Dako. Optimization of concentrated antibodies is required by the end user. Dilutions should be prepared using Antibody Diluent (code S0809) or a diluent containing 0.05 mol/L Tris-HCl buffer with 1% bovine serum albumin (BSA). Dako N-Series ready-to-use antibodies are not optimized for use with Dako "Plus" detection systems.

Negative Control Reagent

Ideally, a negative control reagent contains an antibody which exhibits no specific reactivity with human tissues or normal/nonimmune serum in the same matrix/solution as the diluted primary antibody. The negative control reagent should be the same subclass and animal species as the primary antibody, diluted to the same immunoglobulin or protein concentration as the diluted primary antibody using the same diluent. The incubation period for the negative control reagent should correspond to the primary antibody.

When using Dako NP-Series "Plus" ready-to-use antibodies, Universal Negative Control(s)+ is recommended as a negative control reagent. These controls are optimized for use with either mouse (code NP015) or rabbit (NP001) NP-Series "Plus" ready-to-use antibodies.

For more information regarding negative control reagent preparation, refer to Quality Control section.

Substrate-Chromogen Solution

The following protocol for the preparation of 1 mL of the substrate-chromogen solution is sufficient for up to ten tissue sections or up to five cell smears.

STEP 1 Depending on the number of slides to be stained, transfer enough 1 mL aliquots of Buffer Substrate into the provided calibrated test tube.

STEP 2 For each 1 mL of buffer, add one drop (20 µL) Liquid DAB+ Chromogen. Mix immediately and apply to tissue sections with the provided Pasteur pipette.

The prepared substrate-chromogen solution is stable for approximately five days when stored at 2–8°C. This solution should be mixed thoroughly prior to use. Any precipitate developing in the solution does not affect staining quality.

Rinse test tube and pipette thoroughly after each use.
Used in its entirety, the 18 mL of substrate buffer provided with K4006 will provide adequate volume for 150 tests. An excess volume may remain. Used in its entirety, the 120 mL of substrate buffer provided with K4007 will provide adequate volume for 1100 tests. An excess volume may remain.

Counterstain

The colored end-product of the staining reaction is alcohol insoluble and may be used with alcohol or aqueous-based counterstains such as Mayer's hematoxylin or Lillie's Modified Mayer's Hematoxylin (code S3309). Follow counterstaining of hematoxylin with a thorough rinse in distilled water, and then immerse tissue slides into a bath of 0.037 mol/L ammonia or similar bluing agent. Thirty-seven millimolar ammonia water is prepared by mixing 2.5 mL of 15 mol/L (concentrated) ammonium hydroxide with 1 liter of water.

Unused 0.037 mol/L ammonia may be stored at room temperature (20–25°C) in a tightly capped bottle for up to 12 months.

Consult manufacturers' guidelines for alternative counterstaining procedures.

Mounting Media

Glycergel Mounting Medium (code C0563) or Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-use (code S3025) is recommended for aqueous mounting. Glycergel must be heated to at least 50°C just prior to use. Nonaqueous permanent mounting medium (Ultramount, code S1964) may also be used.

Specimen preparation Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" and/or the Antibody Specification Sheet.

Prior to IHC staining, tissues must be fixed and processed. Fixation prevents autolysis and putrefaction of excised tissues, preserves antigenicity, enhances the refractive index of tissue constituents and increases the resistance of cellular elements to tissue processing. Tissue processing includes dehydration, clearing of dehydrating agents, infiltration of embedding media, embedding and sectioning of tissues. The most common fixatives for IHC tissue preparations are discussed in the general instructions. These are guidelines only. Optimal procedures must be determined and verified by the user.

Staining procedure **Procedural Notes**

The user should read these instructions carefully and become familiar with the kit contents prior to use.

The reagents and instructions supplied in this kit have been designed for optimal performance. Further dilution of the kit reagents or alteration of incubation times or temperatures may give erroneous results.

All reagents should be equilibrated to room temperature (20–25°C) prior to immunostaining. Likewise, all incubations should be performed at room temperature.

Do not allow tissue sections to dry during the staining procedure. Dried tissue sections may display increased nonspecific staining. Cover slides exposed to drafts. If prolonged incubations are used, place tissues in a humid environment.

The sensitivity of the Dako EnVision+ System, HRP can be further increased by lengthening the incubation times of Steps 2 and 3 for 5–10 minutes.

Staining Protocol

STEP 1 PEROXIDASE BLOCK

Tap off excess buffer. Using a lintless tissue (such as Kimwipe or gauze pad), carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep reagent within the prescribed area. Apply enough Peroxidase Block to cover specimen. Incubate 5 (±1) minutes. Rinse gently with distilled water or buffer solution from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue) and place in a fresh buffer bath.

STEP 2 PRIMARY ANTIBODY OR NEGATIVE CONTROL REAGENT

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Apply enough optimally diluted primary antibody or negative control reagent to cover specimen. Incubate 30 (±1) minutes. Rinse gently with buffer solution from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue) and place in a fresh buffer bath.

If the staining procedure must be interrupted, slides may be kept in a buffer bath following incubation of the primary antibody (Step 2) for up to one hour at room temperature (20–25°C) without affecting the staining performance.

- STEP 3 PEROXIDASE LABELLED POLYMER**
 Tap off excess buffer and wipe slides as before.
 Apply enough Labelled Polymer to cover specimen.
 Incubate 30 (±1) minutes.
 Rinse slides as in Step 2.
- STEP 4 SUBSTRATE-CHROMOGEN**
 Wipe slides as before.
 Apply enough of the prepared Liquid DAB+ substrate-chromogen solution to cover specimen (see Reagent Preparation Section).
 Incubate for 5–10 minutes.
 Rinse gently with distilled water from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue). Collect substrate-chromogen waste in a hazardous materials container for proper disposal.
- STEP 5 HEMATOXYLIN COUNTERSTAIN (optional)**
 Immerse slides in a bath of hematoxylin (code S3309). Length of incubation depends on the strength of hematoxylin used.
 Rinse gently in a distilled water bath.
 Dip slides 10 times into a bath of 0.037 mol/L ammonia or similar bluing agent.
 Rinse slides in a bath of distilled or deionized water for 2–5 minutes.
- STEP 6 MOUNTING**
 Specimens may be mounted and coverslipped with an aqueous-based mounting medium such as Glycergel Mounting Medium (code C0563) or Faramount (code S3025) or nonaqueous permanent mounting media, Ultramount (code S1964). Slides can also be dehydrated and permanently mounted.

Quality control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures. See the quality control guidelines of the College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry and references 3 through 5 for additional information. Refer to the specification sheet of each primary antibody used for details regarding sensitivity and immunoreactivity.

Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" for further information on positive and negative controls.

Staining interpretation

Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" for interpretation guidelines.

Limitations

Tissue staining is dependent on the proper handling and processing of tissues prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false-negative results.

Use of old or unbuffered fixatives, or exposure of tissues to excessive heat (greater than 60°C) during processing may result in decreased staining sensitivity.

Endogenous peroxidase or pseudoperoxidase activity can be found in hemoproteins such as hemoglobin, myoglobin, cytochrome, and catalase as well as in eosinophils.^{6,7} This activity can be inhibited by incubating specimens with Peroxidase Block of the Dako EnVision+ System, HRP for five minutes prior to the application of the primary antibody. Blood and bone marrow smears and frozen tissues can also be treated with this reagent. However, this procedure does not abolish the reddish-brown pigment of hemoproteins. Alternately, a solution of methanol-hydrogen peroxide can be used. Some antigens may become denatured with this procedure.

Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase.⁸

Normal/nonimmune sera from the same animal source as the secondary antisera used in blocking steps may cause false-negative or false-positive results due to auto-antibodies or natural antibodies.

The reagents supplied in this kit have been optimally diluted. Further dilution may result in loss of antigen detection.

Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" for general limitations.

Troubleshooting

Problem	Probable Cause	Suggested Action
1. No staining of any slides.	1a. Reagents not used in proper order.	1a. Review application of reagents.
	1b. Sodium azide in buffer bath.	1b. Use fresh, azide-free buffer.
2. Weak staining of all slides.	2a. Sections retain too much solution after wash bath.	2a. Gently tap off excess solution before wiping around section.
	2b. Slides not incubated long enough with antibodies or substrate.	2b. Review recommended incubation times.
3. Excessive background staining in all slides.	3a. Specimens contain high endogenous peroxidase activity.	3a. Use longer incubation time of peroxidase block.
	3b. Paraffin incompletely removed.	3b. Use fresh xylene or toluene baths. If several slides are stained simultaneously, the second xylene bath should contain fresh xylene.
	3c. Slides not properly rinsed.	3c. Use fresh solutions in buffer baths and wash bottles. Use TBST as wash buffer (code S3306).
	3d. Faster than normal substrate reaction due to e.g. excessive room temperature.	3d. Use shorter incubation time with substrate-chromogen solution.
	3e. Sections dried during staining procedure.	3e. Use humidity chamber. Wipe only three to four slides at a time before applying reagent.
	3f. Nonspecific binding of reagents to tissue section.	3f. Apply a blocking solution containing protein.
	3g. Antibody too concentrated.	3g. Use higher dilution of the primary antibody.

NOTE: If the problem cannot be attributed to any of the above causes, or if the suggested corrective action fails to resolve the problem, please call Dako Technical Support at for further assistance.

Additional information on staining techniques and specimen preparation can be found in the *Handbook - Immunochemical Staining Methods*⁹ (available from Dako), *Atlas of Immunohistology*¹⁰ and *Immunoperoxidase Techniques, A Practical Approach to Tumor Diagnosis*.¹¹

8.2 Anexo 2- ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit (Vector Laboratories, Inc. Ref: MP-7402)



ImmPRESS™ REAGENT Anti-Mouse Ig

PEROXIDASE
Cat. No. MP-7402

INSTRUCTIONS FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING USING MOUSE PRIMARY ANTIBODIES

Introduction

The ImmPRESS™ polymerized reporter enzyme staining system is based on a new method of polymerizing enzymes and attaching these polymers to antibodies. The ImmPRESS™ reagents provide very high sensitivity with very low background staining in immunohistochemical applications. The novel approach employed to form enzyme "micropolymers" avoids the use of large dextrans or other macromolecules as a backbone. Attaching these unique "micropolymers" to an antibody allows a higher density of enzymes to access a target with minimal interference. The result is a reduction in the number of steps in the protocol, an increase in signal intensity, and significantly less background staining.

Vector Laboratories, Inc.

30 Ingold Road • Burlingame, CA 94010
Tel: (650) 697-3600 • Fax: (650) 697-0339
E-mail: vector@vectorlabs.com • www.vectorlabs.com

The ImmPRESS™ anti-mouse Ig reagent contains a "micropolymer" of a very active peroxidase coupled to our affinity-purified anti-mouse IgG (I+H) secondary antibody. The ImmPRESS™ reagent is supplied preclipped in a convenient dropper bottle. No mixing or titrating of ImmPRESS™ reagents is necessary to obtain optimal immunohistochemical staining. Ready-to-use 2.5% normal horse serum blocking solution is also included for convenience.

Unless labeled otherwise, ImmPRESS™ reagents are designed for laboratory use only.

ImmPRESS™ DETECTION SYSTEM

The ImmPRESS™ reagent is supplied as of a ready-to-use solution. Dilution of this reagent or changes in suggested incubation time may affect performance. The bottle is fitted with a drop dispenser tip. (To remove the drop dispenser tip, press laterally with thumb until the tip snaps off.) When dispensing drops, hold the bottle in an inverted position and squeeze gently. Secure the cap on the bottle when it is not in use.

When dispensing ImmPRESS™ reagent, apply a sufficient number of drops on the slide to cover the entire section. Slides should then be placed in a humidified chamber during the incubation period.

The staining procedure should be performed at room temperature (20 - 25 °C). The ImmPRESS™ reagent should be equilibrated to room temperature for optimal performance. After completion of the staining procedure, the reagent should be stored at 4 °C (do not freeze).

A number of different wash buffers can be used with the ImmPRESS™ reagents. One of the most common is 10 mM sodium phosphate, pH 7.5, 0.9% saline (PBS), 0.1% Tween™ 20 detergent may be added to the wash buffer and is especially recommended for use with automated stainers.

ENZYME SUBSTRATES

A variety of chromogens can be used to localize peroxidase substrates in tissue sections. Vector Laboratories offers the traditional substrates DAB and AEC as well as several proprietary substrates, producing colors as listed.

These substrates can be used as single labels or to introduce multiple colors in a tissue section.

DAB (Diaminobenzidine), SK-4100, brown
DAB + Ni*, SK-4100, gray/black
Vector® VIP, SK-4600, purple
Vector® SG, SK-4700, blue-gray
Vector® NovaRED™, SK-4800, dark red
TMB, SK-4400, blue
AEC (3-amino-9-ethyl carbazole)*, SK-4200, red

Vector Laboratories also offers a line of peroxidase substrates with increased sensitivity.

ImmPACT™ DAB, SK-4105, brown
ImmPACT™ VIP, SK-4605, purple
ImmPACT™ SG, SK-4705, blue-gray
ImmPACT™ NovaRED™, SK-4805, dark red
ImmPACT™ AEC*, SK-4205, red

* AEC is soluble in alcohol and clearing agents and must be mounted in aqueous mounting media. All other substrates are not soluble in alcohol or clearing agents. They may be dehydrated, cleared, and permanently mounted.

STAINING PROCEDURE FOR PARAFFIN SECTIONS

1. Deparaffinize and hydrate tissue sections through xylenes or other clearing agents and graded alcohol series.
2. Rinse for 5 minutes in tap water.*
3. If quenching of endogenous peroxidase activity is required, incubate the sections for 30 minutes in 0.3% H₂O₂ in either methanol or water. Incubation times may be shortened by using higher concentrations of H₂O₂. If endogenous peroxidase activity does not present a problem, this step may be omitted.
4. Wash in buffer for 5 minutes.
5. When necessary, incubate sections for 20 minutes with ready-to-use (2.5%) normal horse blocking serum or blocking solution of choice.
6. Incubate sections with mouse primary antibody diluted in appropriate antibody diluent solution. (See Note 5)
7. Wash slides for 5 minutes in buffer.
8. Incubate sections for 30 minutes with ImmPRESS™ reagent.
9. Wash slides for 5 minutes in buffer.
10. Incubate sections in peroxidase substrate solution until desired stain intensity develops. (See Note 2)
11. Rinse sections in tap water.

- Counterstain, clear and mount.
- If antigen unmasking is required, perform this procedure after step 2, using Cal. No. H-3300 (citrate-based) or H-3301 (high pH).

STAINING PROCEDURE FOR FROZEN SECTIONS

This procedure is generally appropriate for frozen sections, cell smears or cytocentrifuge preparations.

- Sections are air dried.
 - Immediately before staining, fix sections with acetone or the appropriate fixative for the antigen under study.
 - Transfer slides into buffer.
 - If quenching of endogenous peroxidase is required, use gentle H_2O_2 blocking to reduce the risk of antigen destruction or tissue loss: 0.3% H_2O_2 in 0.3% normal serum in PBS for 5 minutes; or 0.3% H_2O_2 in methanol for 30 minutes, or use other published methods (eg. Andrew, S. M., Jassani, B., *Histochem J.* 1987, **19**, 426-30).
 - Follow steps 4-12 of the procedure recommended for paraffin sections.
- For best results, **Immpress™** reagent should be used before the expiration date.

NOTES:

- Immpress™** reagents can be used in multiple antigen labeling applications. A brochure is available with protocols - "Discovery through color". Please request a printed copy or download from our website: www.vectorlabs.com.
- Solutions containing sodium azide or other inhibitors of peroxidase activity should not be used in diluting the peroxidase substrate.
- Substrate development times may differ depending upon the level of antigen, the intensity of the stain that is required, or the substrate used. **ImmpACT™**, **DAB** and **DAB** generally should be developed for 2-10 minutes; **ImmpACT™ VIP** and **Vector™ VIP** for 2-15 minutes; **ImmpACT™ SG** and **Vector™ SG** for 2-10 minutes; **ImmpACT™ Novared™** and **Vector™ Novared™** for 2-15 minutes; **ImmpACT™ AEC** and **AEC** for 10-30 minutes; **TMB** for 5-20 minutes. Some counterstains may not be compatible with certain peroxidase substrates because of solubility of the reaction products or lack of color contrast. A counterstain compatibility chart is available upon request. Refer to the instructions in the respective substrate kits for further details.

- The section should be well prepared. Fixation (generally, in buffered formalin not exceeding 4 percent formaldehyde) should be sufficient to maintain the integrity of the section throughout the staining procedure but not so harsh as to destroy the antigen under study. During the staining procedure, do not allow the section to dry out. Use a humidified chamber for incubations. In some cases, use of an Antigen Unmasking Solution, Cal. No. H-3300 (citrate-based) or Cal. No. H-3301 (high pH) and exposure to high temperatures can overcome loss of antigens due to fixation.
- To avoid adsorption of the antibody to the plastic or glass container in which the final dilution is made, the primary antibody may be diluted in buffers containing diluted (2.5%) normal horse serum or 0.1% immunohistochemical grade bovine serum albumin (Cal. No. SP-5050). Only immunohistochemical grade BSA should be used, as other preparations can contain undesired impurities.
- Use only freshly prepared buffers. Bacterial contamination which can occur in buffers stored at room temperature may affect the quality of the staining. It is recommended that the substrate solution be prepared with glass distilled water. Chlorinated water (even with low conductivities) may contain inhibitors of peroxidase and can reduce sensitivity.
- Sections of neuronal tissue or sections which are thicker than normal may require longer incubation times for optimal staining.
- To prevent sections from detaching from the glass, slides can be treated with **VECTABOND™** Reagent (Cal. No. SP-1800), a non-protein tissue section adhesive.
- Sections of neuronal tissue or sections which are thicker than normal may require longer incubation times for optimal staining.
- To prevent sections from detaching from the glass, slides can be treated with **VECTABOND™** Reagent (Cal. No. SP-1800), a non-protein tissue section adhesive.
- After mounting, paraffin sections should be dried in a hot air oven at 50-56 °C. Some slide warmers contain "hot spots" that can overheat tissues.
- Specimens should not be embedded in paraffin heated higher than 60 °C; too much heat can destroy antigens.
- Hand tongs can cause sections to detach from slides or may prevent adequate penetration of reagents. Avoid touching trape baths with oily hands.
- Paraffin tissue blocks should be stored in sealed containers in a cool location.
- Complete deparaffinization is important. Clearing agents and alcohol solutions should be changed regularly. All steps of the deparaffinization should be sufficiently long to completely remove the paraffin from the sections.
- To reduce the risk of introducing contaminants, avoid removing the drop dispenser from the stock solution bottle unless dispensing large volumes. Avoid pipetting **Immpress™** reagent directly from the bottle.

Peroxidase Substrates

These kits provide sufficient stock reagents to prepare about 300 ml of substrate solution:

Substrate	Kit	SK-4100
DAB Substrate	1 KIT	SK-4100
Vector™ VIP Substrate	1 KIT	SK-4600
Vector™ SG Substrate	1 KIT	SK-4700
Vector™ Novared™ Substrate	1 KIT	SK-4900
TMB Substrate	1 KIT	SK-4400
AEC Substrate	1 KIT	SK-4200

More sensitive versions of most of these substrates are also available as **ImmpACT™** substrates:

ImmpACT™ DAB	120 ml	SK-4105
ImmpACT™ VIP Substrate	120 ml	SK-4605
ImmpACT™ SG Substrate	120 ml	SK-4705
ImmpACT™ Novared™ Substrate	120 ml	SK-4905
ImmpACT™ AEC Substrate	120 ml	SK-4205

Other related reagents also available are:

Immpress™ Reagent Anti-Rabbit Ig	1 KIT	MP-7401
Immpress™ Reagent Anti-House Ig	KIT	MP-7422
Immpress™ Reagent Anti-Rat Ig (not adsorbed)	KIT	MP-7404
Immpress™ Reagent Anti-Rat Ig (mouse adsorbed)	KIT	MP-7444
Immpress™ Reagent Anti-Goat Ig	KIT	MP-7405
Immpress™ Universal Reagent Anti-House/Rabbit Ig	KIT	MP-7500
Vectalount™ Mounting Medium	60 ml	H-5000
Vectalount™ AO Mounting Medium	60 ml	H-5501
Antigen Unmasking Solution (100x) Citrate-based	250 ml	H-3300
High pH	250 ml	H-3301
Bovine Serum Albumin (BSA)	500 mg	SP-5050
VECTABOND™ Reagent	7 ml	SP-1800
Vector™ Hematoxylin	500 ml	H-3401
Vector™ Hematoxylin OS	100 ml	H-3404
Vector™ Methyl Green	500 ml	H-3402
Vector™ Nuclear Fast Red	500 ml	H-3403
ImmpEdge™ Hydrophobic Barrier Pen	2-pen set	H-4000
ImmpEdge™ Histology Pen	5-pen set	H-6100
Mouse IgG Control Antibody	1 mg	I-2000

A complete catalog listing is available upon request.

Visit our website: www.vectorlabs.com



8.3 Anexo 3- UltraVision LP (LABVision. Ref: TL-015-HD)



INSTRUCTIONS FOR USE
TL-XXX-HD
Rev 010109I
Page 1 of 2

UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen

INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use

AVAILABILITY:

Catalog #	Slide Volume
TL-015-HD	75-150 slides
TL-060-HD	300-600 slides
TL-125-HD	625-1250 slides

SPECIFICITY:

Anti-Mouse IgG (H+L), Anti-Rabbit IgG (H+L)

ENZYME:

Peroxidase

CHROMOGEN/SUBSTRATE:

Diaminobenzidine (DAB)

REAGENTS

Qty.	Component	TL-015-HD	TL-060-HD	TL-125-HD
1	Hydrogen Peroxide Block	TA-015-HP	TA-060-HP	TA-125-HP
1	Ultra V Block	TA-015-UB	TA-060-UB	TA-125-UB
1	Primary Antibody Enhancer	TL-015-PB	TL-060-PB	TL-125-PB
1	HRP Polymer	TL-015-PH	TL-060-PH	TL-125-PH
1	DAB Plus Substrate	TA-015-HSX	TA-060-HSX	TA-125-HSX
1	DAB Plus Chromogen	TA-001-HCX	TA-002-HCX	TA-004-HCX

(The three-digit number in the middle of each Catalog # designates the reagent volume in mL or number of tablets.)

DESCRIPTION (New protocol: See changes high-lighted below)

UltraVision LP is the latest technology in polymeric labeling. Polymer detection methods have been shown to provide increased sensitivity and detection simplicity. This second-generation polymer system is composed of smaller polymer subunits that minimize conflicts in binding the target protein. Decreased binding conflicts result in more consistent staining and better signal amplification.¹ Ultimately, this gives the user higher sensitivity and antibody efficiency.² With UltraVision LP, you use less antibody and obtain better signal-to-noise ratios. UltraVision LP is also biotin-free, which eliminates background staining found with traditional biotin-based detection methods.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

This UltraVision detection system detects a specific mouse IgG or rabbit IgG antibody bound to an antigen in tissue sections. The specific antibody is located by a universal secondary antibody formulation conjugated to an enzyme-labeled polymer that recognizes mouse and rabbit immunoglobulins. The polymer complex is then visualized with an appropriate substrate/chromogen.

WARNINGS & PRECAUTIONS

Refer to MSDS.

STORAGE & SHELF LIFE

Store at 2-8°C. Each component is stable for up to 18 months.

MICROBIOLOGICAL STATE

Product(s) not sterile.

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
<http://www.thermo.com/labvision>



Manufactured by:
LabVision Corporation



Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Primary antibody. Diluent.

SPECIMEN & REAGENT PREPARATION

Refer to Procedure.

PROCEDURE

STAINING PROTOCOL (kit components in bold):

1. Deparaffinize and rehydrate tissue section.
2. Wash 2 times in buffer.
3. If required, incubate tissue in digestive enzyme (or appropriate pretreatment).
4. Wash 4 times in buffer.
5. To reduce nonspecific background staining due to endogenous peroxidase, incubate slide in **Hydrogen Peroxide Block** for 10 minutes.
6. Wash 4 times in buffer.
7. Apply **Ultra V Block** and incubate for 5 minutes at room temperature to block nonspecific background staining. **NOTE:** Do not exceed 10 minutes or there may be a reduction in desired stain. (May be omitted if primary antibodies are diluted in buffers containing 5-10% normal goat serum.)
8. Wash (Optional).
9. Apply primary antibody and incubate according to manufacturer's recommended protocol.
10. Wash 4 times in buffer.
11. Apply **Primary Antibody Enhancer** and incubate for 10 min at room temperature.
12. Wash 4 times in buffer.
13. Apply **HRP Polymer** and incubate for 15 minutes at room temperature. (**NOTE:** HRP Polymer is light sensitive. Please avoid unnecessary light exposure and store in opaque vial.)
14. Wash 4 times in buffer.
15. Add 1 drop (40 µl) **DAB Plus Chromogen** to 2 ml of **DAB Plus Substrate**, mix by swirling and apply to tissue. Incubate for 5 minutes, depending on the desired stain intensity.
16. Wash 4 times in DI water.
17. Counterstain and coverslip using a permanent mounting media.

The specificity and sensitivity of antigen detection is dependent on the specific primary antibody used.

REFERENCES

1. Shan-Rong Shi, James Guo, Richard J. Cote, Lillian Young, Debra Hawes, Yan Shi, Sandra Thu, and Clive R. Taylor, Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, vol 7, 201-208, 1999.
2. Karen Petrosyan, Rosalba Tamayo, and Daisy Joseph, "Sensitivity of a Novel Biotin-free Detection Reagent (PowerVision+) for Immunohistochemistry" J. Histotechnology, vol 25, 247-250, 2002.

TROUBLESHOOTING

Please contact Thermo Fisher Scientific Technical Support by phone (1-510-991-2800 or 1-800-828-1628) or by email (lab.reagents@thermofisher.com).

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
<http://www.thermo.com/labvision>



Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
Labvision.uk@thermofisher.com

8.4 Anexo 4 - NovoLink Polymer Detection System (Novocastra™. Ref: RE7140-CE).

Novocastra™

NovoLink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

Product No: RE7280-K

NovoLink™ Polymer Detection System (500 tests)

Product No: RE7150-K

NovoLink™ Polymer Detection System (250 tests)

Product No: RE7140-K

NovoLink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

Product No: RE7290-K

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NovoLink™ Polymer Detection Systems are used for the visualization of mouse IgG, mouse IgM and rabbit IgG primary antibodies. NovoLink™ Polymer and NovoLink™ DAB (Polymer) contain component reagents of these systems and are intended for use in the procedure described below. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

The first immunohistochemical technique was reported by Nakane and Pierce.¹ Since then many developments have occurred, leading to increased sensitivity over earlier techniques. A recent development has been the use of polymeric labeling. This technology has been applied to both primary antibodies² and detection systems. The NovoLink™ Polymer Detection Systems utilize a novel controlled polymerization technology to prepare polymeric HRP-linker antibody conjugates. Therefore, the problem of non-specific staining that can occur with Streptavidin/Biotin detection systems due to endogenous biotin does not occur.

These products are used in an immunohistochemical (IHC) procedure, which allows the qualitative identification by light microscopy of antigens in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, via sequential steps with interposed washing steps. If required by the primary antibody, sections are subjected to epitope retrieval prior to staining. Endogenous peroxidase activity is neutralized using the Novocastra™ Peroxidase Block. This is followed by application of the Novocastra™ Protein Block to reduce non-specific binding of primary and polymer. The section is subsequently incubated with optimally diluted primary antibody. Novocastra™ Post Primary Block is used to enhance penetration of the subsequent polymer reagent. The NovoLink™ Polymer recognizes mouse and rabbit immunoglobulins, it detects any tissue-bound primary antibody. Sections are further incubated with the substrate/chromogen, 3,3' - diaminobenzidine (DAB), prepared from Novocastra™ DAB Chromogen and NovoLink™ DAB Substrate Buffer (Polymer), as described below. Reaction with the peroxidase produces a visible brown precipitate at the antigen site. Sections are counterstained with Novocastra™ Hematoxylin and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Reagents Provided

Details of which reagents from the following list are supplied in each product are given in the table below.

1. Peroxidase Block. 3% Hydrogen peroxide.
2. Protein Block. 0.4% Casein in phosphate-buffered saline, with stabilizers, surfactant, and 0.2% Bronidox L as a preservative.
3. Post Primary Block. Polymer penetration enhancer containing 10% (v/v) animal serum in tris-buffered saline/0.09% ProClin™ 950.
4. NovoLink™ Polymer. Anti-mouse/rabbit IgG -Poly-HRP (each at 8µg/ml) containing 10% (v/v) animal serum in tris-buffered saline/0.09% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen. 1.74% w/v 3,3' - diaminobenzidine, in a stabilizer solution.
6. NovoLink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Buffered solution containing 0.05% hydrogen peroxide and preservative.
7. Hematoxylin. 0.02% Hematoxylin.

Reagent	Product Number	NovoLink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	NovoLink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	NovoLink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	NovoLink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary Block	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
NovoLink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
NovoLink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary Block	RE7159	1 x 125ml			
NovoLink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
NovoLink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary Block	RE7167				1 x 5ml
NovoLink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
NovoLink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

The Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary Block, NovoLink™ Polymer and Hematoxylin are prediluted. Reconstitution, mixing, dilution, or titration of these reagents is not recommended. Further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change. The DAB Chromogen requires dilution to 1/20 in NovoLink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) prior to use. Further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change.

Storage and Stability

Store at 2-8°C. Do not freeze. Return to 2-8°C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the product label. Storage conditions other than those specified must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product therefore positive and negative controls should be run simultaneously with patient samples.

Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

Warnings and Precautions

One or more components in the product is hazardous.



DAB Chromogen. A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.novocastra.co.uk

Peroxidase Block, Protein Block, Hematoxylin, Post Primary Block, NovoLink™ Polymer. A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.novocastra.co.uk

For professional users.

Do not mix reagents from different detection systems.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.⁴

Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucus membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.

Consult Federal, State or local regulations for disposal of any potentially toxic components. Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. Any such change must be validated by the user.

Procedure

A. Reagents required but not supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 50mM tris-buffered saline (TBS) pH7.6.
3. Antigen retrieval solution(s).
4. Enzyme retrieval solution(s).
5. Antibody diluent.
6. Primary antibody.
7. Mounting medium.

B. Equipment required but not supplied

1. Equipment required for antigen retrieval, if recommended for the primary antibody.
2. General immunohistochemistry laboratory equipment.

C. Methodology

Prior to undertaking this methodology, users must be trained in immunohistochemical techniques.

All steps must be followed as directed or performance may be impaired.

The combination of the primary antibody, its dilution, together with the detection system should be validated by the user on a series of known positive and negative controls.

Unless indicated, all steps are performed at room temperature (25°C).

1. Cut and mount sections on slides coated with a suitable tissue adhesive.
2. De-paraffinize sections in xylene or xylene substitutes.
3. Re-hydrate through graded alcohols.
4. Wash slides in running tap water.
5. Perform antigen retrieval as required (see **Recommendations for Use** for primary antibody).
6. Wash slides in de-ionised water.
7. Neutralize endogenous peroxidase using Peroxidase Block for 5 minutes.
8. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
9. Incubate with Protein Block for 5 minutes.
10. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
11. Incubate with optimally diluted primary antibody (see **Recommendations for Use** for primary antibody).
12. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
13. Incubate with Post Primary Block for 30 minutes.
14. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
15. Incubate with NovoLink™ Polymer for 30 minutes.
16. Wash in TBS for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
17. Develop peroxidase activity with DAB working solution (see **DAB Working Solution**) for 5 minutes.
18. Rinse slides in water.
19. Counterstain with Hematoxylin.
20. Rinse slides in water for 5 minutes.
21. Dehydrate, clear and mount sections.

DAB Working Solution

Add 50µl of DAB Chromogen to 1ml of NovoLink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Use within six hours of preparation.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures. Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques. One positive tissue control should be included for each set of test conditions/primary antibody in each staining run. A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.⁵ For recommended positive control tissue see primary antibody Instructions for Use. If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. For recommended negative control tissue see primary antibody Instructions for Use. Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user. Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.⁶ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin⁷ (eg. liver, breast, brain, kidney). To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate-chromogen, Streptavidin-HRP or labeled polymer, and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

Patient Tissue

Examine patient specimens last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁸

Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

NovoLink™ Polymer Detection Systems and their components are for use on paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Performance Characteristics

The performance of NovoLink™ Polymer Detection Systems, NovoLink™ Polymer and NovoLink™ DAB (Polymer) have been validated using a range of Novocastra™ mouse IgG, mouse IgM and rabbit IgG primary antibodies.

*Weak staining may be seen with antibodies of IgM isotype.

These products are stable up to the expiry date(s) printed on the product label.

Bibliography

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929-931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen- applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108-115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular morphology*. 1999; 7:201-208.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
5. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
6. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
8. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Amendments to Previous Issue

The Reagents Provided has changed.

Date of Issue

06 September 2006 (RE7140-K, RE7150-K/RE7280-K, RE7290-K/CE/UK) (Form711 rev- 14/07/04).



Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Kappa Light Chain

Product Code: NCL-KAP

Intended Use	FOR RESEARCH USE ONLY.
Specificity	Human kappa immunoglobulin light chain (free or bound to heavy chain isotypes).
Clone	kp-53.
Ig Class	IgG1.
Antigen Used for Immunizations	Purified human Bence Jones kappa protein.
Hybridoma Partner	Mouse myeloma (p3-NS1-Ag4-1).
Preparation	Lyophilized tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide. Reconstitute with the volume of sterile distilled water indicated on the vial label.
Effective on Frozen Tissue	Yes.
Effective on Paraffin Wax Embedded Tissue	Yes. It is recommended that tissue be fixed in either primary formal sublimate or secondary formal sublimate after primary formalin fixation. Testing material fixed in formalin has revealed a progressive loss of reactivity when the fixation time exceeds 24 hours.
Recommendations on Use	Immunohistochemistry: Typical working dilution 1:100. Trypsin digestion of paraffin sections may enhance staining in some cases. 60 minutes primary antibody incubation at 25 °C. Standard ABC technique. Western Blotting: Typical working dilution 1:500-1:1000.
Positive Controls	Immunohistochemistry: Tonsil. Western Blotting: Tonsil.
Staining Pattern	Generally, in paraffin-embedded tissue cytoplasmic immunoglobulin will stain, for example, in myeloma or plasmacytoma. Membrane bound immunoglobulin is generally only demonstrated using frozen sections.
Storage and Stability	Store unopened lyophilized antibody at 4 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 4 °C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the antibody are frozen at -20 °C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use.
General Overview	Immunoglobulins are polypeptides and comprise five major classes; immunoglobulin G (IgG), IgA, IgM, IgD and IgE. Each immunoglobulin consists of two identical heavy (H) chains and two identical light (L) chains. These are also subdivided into sub classes eg. IgG1. There are two classes of light chain; kappa and lambda. The ratio of kappa chains and light chains varies between Ig classes and subclasses, but is also species specific. In humans, approximately 80% of light chains are kappa. However, in any particular immunoglobulin molecule the light chain will be either kappa or lambda - never a mixture. B cells contain either kappa or lambda mRNA.
General References	Kochwa B. American Society for Microbiology. 17-35 (1978). Walderstrom J.G. Vanderbilt University Press, Nashville. (1988).

Leica Microsystems Novocastra Ltd
Sallis Business Park West
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8DN
United Kingdom
T: +44 (0)191 215 4242



FRUJ/NDL-KAP/08/03



Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Lambda Light Chain

Product Code: NCL-LAM

Intended Use:	FOR RESEARCH USE ONLY.
Specificity:	Human lambda immunoglobulin light chain (free or bound to heavy chain isotypes).
Clone:	HP-6054
Ig Class:	IgG2a
Antigen Used for Immunizations:	Purified human IgG myeloma proteins covalently coupled to polyamincaprylene micro beads.
Hybridoma Partner:	Mouse myeloma (p3-N81-Ag4-1).
Preparation:	Lyophilized tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide. Reconstitute with the volume of sterile distilled water indicated on the vial label.
Effective on Frozen Tissue:	Yes
Effective on Paraffin Wax Embedded Tissue:	Yes. It is recommended that tissue be fixed in either primary formal sublimate or secondary formal sublimate after primary formalin fixation. Testing material fixed in formalin has revealed a progressive loss of reactivity when the fixation time exceeds 24 hours.
Recommendations on Use:	Immunohistochemistry: Typical working dilution 1:200–1:300. Trypsin digestion of paraffin sections may enhance staining in some cases. 90 minutes primary antibody incubation at 25 °C. Standard ABC technique. Western Blotting: Typical working dilution 1:50–1:100.
Positive Controls:	Immunohistochemistry: Tonsil. Western Blotting: Tonsil.
Staining Pattern:	Generally, in paraffin-embedded tissue cytoplasmic immunoglobulin will stain, for example, in myeloma or plasmacytoma. Membrane bound immunoglobulin is generally only demonstrated using frozen sections.
Storage and Stability:	Store unopened lyophilized antibody at 4 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 4 °C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the antibody are frozen at -20 °C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use.
General Overview:	Immunoglobulins are polypeptides and comprise five major classes; immunoglobulin G (IgG), IgA, IgM, IgD and IgE. Each immunoglobulin consists of two identical heavy (H) chains and two identical light (L) chains. These are also subdivided into sub classes (eg. IgG1). There are two classes of light chain; kappa and lambda. The ratio of kappa chains and light chains varies between Ig classes and subclasses, but is also species specific. In humans, approximately 80% of light chains are kappa. However, in any particular immunoglobulin molecule the light chain will be either kappa or lambda - never a mixture. B cells contain either kappa or lambda mRNA.
General References:	Reimer G B, Phillips G J, Aloisi G H, et al.: <i>Hybridoma</i> : 3: 263–275 (1984).



8.7 Anexo 7 – Caldesmon - h-CD - DakoCytomation



FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Caldesmon
Clone h-CD
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS054

English Intended use	<p>For in vitro diagnostic use.</p> <p>FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Caldesmon, Clone h-CD, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody is useful for the identification of tumors with smooth muscle cell differentiation (1-2). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.</p>
Summary and explanation	<p>Caldesmon is a developmentally regulated protein involved in smooth muscle and non-muscle contraction (3,4).</p> <p>Refer to Dako's <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.</p>
Reagent provided	<p>Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L NaN₃.</p> <p><u>Clone:</u> h-CD <u>Isotype:</u> IgG1, kappa</p>
Immunogen	<p>Crude human uterus extract (1)</p>
Specificity	<p>Two closely related variants of human caldesmon have been identified which differ in their electrophoretic mobility and cellular distribution. The <i>h</i>-caldesmon variant (120–150 kDa) is predominantly expressed in smooth muscle whereas <i>l</i>-caldesmon (70–80 kDa) is found in non-muscle tissue and cells. Neither of the two variants have been detected in skeletal muscle (3). Monoclonal anti-caldesmon, h-CD, recognizes only the 150 kDa variant (<i>h</i>-caldesmon) in Western blots of human aortic media extracts and is unreactive with fibroblast extracts from cultivated human foreskin (1).</p>
Precautions	<ol style="list-style-type: none">1. For professional users.2. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
Storage	<p>Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.</p>
Specimen preparation including materials required but not supplied	<p>The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.</p> <p>Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012/K8014).</p> <p><u>Deparaffinized sections:</u> Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide.</p> <p>Follow the pre-treatment procedure outlined in the package Insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012/K8014). The following parameters should be</p>

used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Rinse sections with diluted room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012).

Paraffin-embedded sections: As alternative specimen preparation, both deparaffinization and epitope retrieval can be performed in the PT Link using a modified procedure. See the PT Link User Guide for instructions. After the staining procedure has been completed, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako Silanized Slides (Code S3003) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ FLEX+, Mouse High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8012). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 uL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 uL dispense volume)

Autoprogram (without counterstaining): CALD or Autoprogram (with counterstaining): CALDH

The Auxiliary step should be set to "rinse buffer" in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to "none." This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator's Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in "Performance characteristics."

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include smooth muscle cells and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in "Performance characteristics" in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

Staining interpretation

The cellular staining pattern is cytoplasmic.

Performance characteristics

Normal tissues: Monoclonal anti-caldesmon was found to localize *h*-caldesmon in cryostat sections of human tissues including developing visceral smooth muscle from 10–20 week-old fetal trachea, esophagus, jejunum and uterus. Aortic smooth muscle cells from 10 and 20 week-old fetuses were unreactive with anti-caldesmon (1). In the adult, caldesmon expression was demonstrated in vascular and visceral smooth muscle cells but not epithelial cells, endothelial cells or connective tissue fibroblasts. Cells of the tunica media and a subpopulation of smooth muscle cells of the sub-endothelial intima of the adult aorta were shown to stain positively with anti-caldesmon (1). In immunohistochemical (IHC) studies on cryostat sections of normal human breast, monoclonal anti-caldesmon labeled the smooth muscle cells of blood vessels and a subset of myoepithelial cells in the galactophorous sinuses. Myoepithelial cells of the lobules, ducts and luminal epithelial cells of normal breast did not react positively (5).

Abnormal tissues: In IHC studies on breast carcinoma, monoclonal anti-caldesmon has been demonstrated to label a subpopulation of myoepithelial cells but is unreactive with myofibroblasts and tumor cells (6). This antibody is also used to identify tumors with smooth muscle cell differentiation such as leiomyomas, angioleiomyomas, leiomyosarcomas, eight rhabdomyosarcomas, malignant fibrous histiocytomas, desmoids, and glomus tumors (2).

8.8 Anexo 8 - CD 105 - SN6h - DakoCytomation



Monoclonal Mouse Anti-Human CD105, Endoglin Clone SN6h

ENGLISH
Code M3527

Intended use
For In Vitro Diagnostic Use.

Synonym
GP160

Summary and explanation

Endoglin is a Type I transmembrane protein which is highly expressed on human vascular endothelial cells. Up-regulation of endoglin expression has been demonstrated in tumor vasculature and proliferating cells, suggesting that it is a proliferation-associated endothelial cell marker.^{2,3} Endoglin exists as an O- and N-glycosylated homodimer of 95 kD subunits and was designated CD105 at the Fifth International Workshop on Leucocyte Differentiation Antigens (Boston).⁴

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Anti-endoglin, SN6h, is a mouse monoclonal antibody supplied in liquid form as tissue culture supernatant (containing fetal bovine serum) dialyzed against 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2 and 0.015 mol/L sodium azide. Contains stabilizing protein.

Clone: SN6h¹ Isotype: IgG₁, kappa
Mouse IgG concentration mg/L: See label on vial.

Immunogen

Purified CP160 from cell membrane glycoproteins of fresh non-T/non-B acute lymphoblastic leukemia cells¹

Specificity

Endoglin has been demonstrated to be a component of the transforming growth factor (TGF) β receptor system in human umbilical vein endothelial cells and binds TGF β 1 and β 3 with high affinity, but not TGF β 2.^{4,5} Monoclonal mouse anti-endoglin, SN6h, was originally described as reacting with GP160, a human leukemia-associated cell surface glycoprotein,^{1,6} which was later identified as endoglin.⁷

Materials required, but not supplied

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* and/or the detection system instructions.

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, NaN₃ may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused reagents should be disposed of according to local, State, and Federal regulations.

Storage

Store at 2–8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Staining procedure

Follow the recommended procedure for the detection system selected.

Specimen preparation

Paraffin Sections

Anti-endoglin, SN6h, can be used on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. In order for this antibody to perform optimally on paraffin-embedded tissues, a high sensitivity detection system is required, such as CSA (code K1500) or LSAB+ HRP (code K0679). Monoclonal anti-endoglin, SN6h, may be used at a dilution of 1:2000 in the CSA detection system, determined on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. When using the CSA detection system, pretreatment of tissue with proteolytic enzymes is not recommended.

Anti-endoglin, SN6h, may also be used at a dilution of 1:5 to 1:10 with other high sensitivity detection systems such as the LSAB+ HRP method. Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections with proteolytic enzymes should be performed prior to staining. When using anti-endoglin with this detection system, one may observe a relative decrease in sensitivity compared to results obtained with the CSA system. These recommended dilutions are guidelines only, optimal dilutions should be determined by the individual laboratory.

Cryostat Sections and Cell Smears

Anti-endoglin can also be used to label cryostat sections or cell smears with the LSAB method.

Staining interpretation

The cellular staining pattern for anti-endoglin is cytoplasmic.

Performance characteristics

Normal Cells

Endoglin has been found on endothelial cells of capillaries, arterioles, small arteries, venules and high endothelial venules in a variety of tissues. Positive tissues include liver, kidney, skin, urethra, thyroid, lymph node, tonsil, umbilical cord, ovarian tube, thymus, spleen, and lung. In tonsil, lymph node and thymus, all endothelial cells, including those of high endothelial venules, express endoglin.^{4,8,9} Endoglin expression has also been demonstrated on immature proerythroblasts, syncytiotrophoblasts, activated macrophages and stromal fibroblasts from adult and fetal lung and skin.^{4,9,10}

Tumor Cells

Endoglin expression has been demonstrated on non-T/non-B and pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myelocytic and myelo-monocytic leukemia cells.^{6,8} Hairy Cell leukemic cells have also been found to express endoglin.¹¹



Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody CD45RA

Product Code: NCL-B1

Intended Use	FOR RESEARCH USE ONLY.
Specificity	Human CD45RA antigen.
Clone	X148
Ig Class	IgG1
Antigen Used for Immunizations	Peripheral blood cells from a patient with T cell lymphoma.
Hybridoma Partner	Mouse myeloma (p3-NS1-Ag4-1).
Preparation	Lyophilized tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide. Reconstitute with the volume of sterile distilled water indicated on the vial label.
Effective on Frozen Tissue	Yes
Effective on Paraffin Wax Embedded Tissue	Yes
Recommendations on Use	Immunohistochemistry: Typical working dilution 1:25. 60 minutes primary antibody incubation at 25 °C. Standard ABC technique. Also effective in indirect flow cytometry. Western Blotting: Not evaluated.
Positive Controls	Immunohistochemistry: Tonsil
Staining Pattern	Membranes and cytoplasm of normal B-cells.
Storage and Stability	Store unopened lyophilized antibody at 4 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 4 °C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the antibody are frozen at -20 °C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use.
General Overview	The CD45R subfamily comprises a restricted form of the leucocyte common antigen and is divided into three isoforms: CD45RA, CD45RB and CD45RO. The CD45RA molecule, a 220 kd isoform of CD45, is found on B-cells, monocytes and a small proportion of T cells.
General References	Davey F R, Gatter K C, Raffkiaer E. American Journal of Pathology. 129: 54–63 (1989). Norton A J and Isaacson P G. American Journal of Pathology. 128: 225–240 (1987).





Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD79a

Product Code: NCL-L-CD79a-192

Intended Use	FOR RESEARCH USE ONLY.
Specificity	Human CD79a antigen.
Clone	11D10
Ig Class	IgG2b
Antigen Used for Immunizations	Prokaryotic recombinant fusion protein corresponding to the internal domain of 61 amino acids at the C-terminal region of the CD79a molecule.
Hybridoma Partner	Mouse myeloma (p3-NS1-Ag4-1).
Preparation	Liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide. Volume as indicated on vial label.
Effective on Frozen Tissue	Yes. Acetone fixation recommended.
Effective on Paraffin Wax Embedded Tissue	Yes (using the high temperature antigen unmasking technique: see overleaf).
Recommendations on Use	Immunohistochemistry: Typical working dilution 1:50–1:100. High temperature antigen unmasking technique. 60 minutes primary antibody incubation at 25 °C. Standard ABC technique. Western Blotting: Not recommended. Effective in indirect flow cytometry.
Positive Controls	Immunohistochemistry: Tonsil. Indirect flow cytometry: Tonsil.
Staining Pattern	Membrane.
Storage and Stability	Store liquid antibody at 4 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. Prepare working dilutions on the day of use.
General Overview	The CD79 complex is a disulphide-linked heterodimer which is non-covalently associated with membrane-bound immunoglobulins on B cells. This complex of polypeptides and immunoglobulin constitute the B cell antigen receptor. The two components of this complex are designated CD79a and CD79b, respectively. The CD79a antigen first appears at the pre-B cell stage early in maturation, and persists until the plasma cell stage where it is found as an intracellular component. It is not present in myeloid or T cell lines. Clone 11D10, is recommended for examining bone marrow trephines in research studies.
General References	Kanavaros P, Gaulard P, Charlotte F, et al.. American Journal of Pathology. 146 (3): 735–741 (1995). Buccheri V, Mihaljevic B, Matutes E, et al.. Blood. 82 (3): 853–857 (1993). Verschuren M C M, Comans-Bitter W M, Kapteijn C A C, et al.. Leukemia. 7 (12): 1939–1947 (1993). van Noesel C J M, Brouns G S, van Schijndel G M W, et al.. Journal of Experimental Medicine. 175: 1511–1519 (1992). Mason D Y, Cordell J L, Tse A G D, et al.. The Journal of Immunology. 147 (8): 2474–2482 (1991).



8.11 Anexo 11 - CD 8 - 4B11 - Novocastra TM

Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody CD8

Product Code: NCL-CD8-4B11

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-CD8-4B11 is intended for the qualitative identification by light microscopy of CD8 molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Clone

4B11

Immunogen

Peptide corresponding to the alpha chain cytoplasmic portion of the human CD8 molecule.

Specificity

Human CD8 antigen.

Reagent Composition

NCL-CD8-4B11 is a lyophilized tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative. The user is required to reconstitute the contents of the vial with the correct volume of sterile distilled water as indicated on the vial label.

Ig class

IgG2b

Total Protein Concentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 28.8 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:20–1:40 for 60 minutes at 25 °C. High temperature antigen retrieval using 1 mM EDTA retrieval solution (pH 8.0) is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Storage and Stability

Store unopened antibody at 2–8 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. Do not use after expiration date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 2–8 °C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the reconstituted antibody are stored frozen at -20 °C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use. Return to 2–8 °C immediately after use. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.¹ Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.

Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures. Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.²

Recommended positive control tissue is tonsil

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody.

Recommended negative control tissue is cerebellum.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.³ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products.

They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-CD8-4B11 last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Results Expected

Normal Tissues

Clone 4B11 detected the CD8 antigen on the cell surface of the cytotoxic sub-population of T cells in normal and inflamed tissues (n=87), including tonsil, spleen and Crohn's disease.

Abnormal Tissues

Clone 4B11 stained 8/17 T cell lymphomas. B cell lymphomas and non-lymphoid tumors (n=58) were negative, except for reactive T cells.

NCL-CD8-4B11 is recommended for use as part of a panel of antibodies in the characterization of T cell disorders.

General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artefacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁴ Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Bibliography - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

5. Williamson SLH, Steward M, Milton I et al. New monoclonal antibodies to the T cell antigens CD4 and CD8. *American Journal of Pathology* 1998; 152(6), 1421–1426.
6. Agyekum S, Church A, Sohail M et al. Expression of lymphotoxin-beta (LT-beta) in chronic inflammatory conditions. *Journal of Pathology*. 2003; 199(1): 115–121.
7. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK et al. Short-term preoperative radiotherapy interferes with the determination of pathological parameters in rectal cancer. *Journal of Pathology*. 2002; 197(1): 20–27.
8. de Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A et al. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *Journal of Pathology*. 2000; 190(5): 619–626.

Amendments to Previous Issue

Not applicable.

Date of Issue

16 June 2008 (NCL-CD8-4B11/CE/UK).



Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Carcinoembryonic Antigen (CD66e)

Product Code: NCL-L-CEA-2

Intended Use	FOR RESEARCH USE ONLY.
Specificity	Human carcinoembryonic antigen (CD66e).
Clone	12-140-10
Ig Class	IgG1
Antigen Used for Immunizations	CEA isolated from liver metastasis of colorectal carcinomas by PCA extraction followed by ion exchange and gel filtration chromatography.
Hybridoma Partner	Mouse myeloma (X63-Ag8).
Preparation	Liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide. Volume as indicated on vial label.
Effective on Frozen Tissue	Yes
Effective on Paraffin Wax Embedded Tissue	Yes
Recommendations on Use	Immunohistochemistry: Typical working dilution 1:100–1:200. Trypsin digestion of paraffin sections is recommended. 60 minutes primary antibody incubation at 25 °C. Standard ABC technique. Western Blotting: Not evaluated.
Positive Controls	Immunohistochemistry: Colonic adenocarcinoma.
Staining Pattern	Cytoplasmic and luminal membrane.
Storage and Stability	Store liquid antibody at 4 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. Prepare working dilutions on the day of use.
General Overview	Carcinoembryonic antigen (CD66e) is a heterogeneous cell surface glycoprotein produced by cells of fetal colon. Low levels are also found on normal mucosal epithelia of the adult colon and a variety of other normal tissues. CD66e is encoded by the CEA gene that is located on chromosome 19. It is a member of the CEA gene family, which in turn is a subfamily of the immunoglobulin superfamily. Cell adhesion properties are now well recognized for CD66e. It is believed that the expression of this glycoprotein in conjunction with other known adhesion molecules will influence cell-cell interaction.
General References	Sanders D S, Wilson C A, Bryant F J, et al.. Gut. 35 (8): 1022–1025 (1994). Börner O P. ISBN 82–7633–014–2 (1992). Börner O P. Clinical Chemistry. 37: 231–236 (1991). Nishi M, Inazawa J, Inoue K, et al.. Cancer Genetics and Cytogenetics. 54: 77–81 (1991). Börner O P and Nustad K. Journal of Immunological Methods. 127: 171–178 (1990). Börner O P. Journal of Immunological Methods. 121:85–93 (1989). Roitt I, et al.. Immunology Second Edition 1989. Ellis I O and Hitchcock A. Pathology. 41: 1064–1067 (1988). Pflatz M, Odermatt B, Christen B, et al.. Virchows Archiv A-Pathological Anatomy and Histopathology. 411 (4): 387–393 (1987). Thompson J A, Pande H, Paxton R J, et al.. Proceedings of the National Academy of Sciences. 84: 2965–2969 (1987). Börner O P. Clinical Biochemistry. 15: 128–132 (1982).

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park West
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
☎ +44 191 215 4242



FRUO/NCL-L-CEA-2/06/08

8.13 Anexo 13 - CK 7 - OV-TL 12/30 - Novocastra TM

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Cytokeratin 7

Product Code: NCL-L-CK7-OVTL

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-CK7-OVTL is intended for the qualitative identification by light microscopy of Cytokeratin 7 molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Clone

OV-TL 12/30

Immunogen

OTN 11 ovarian carcinoma cell line.

Specificity

Human cytokeratin 7 intermediate filament protein.

Reagent Composition

NCL-L-CK7-OVTL is a liquid tissue culture supernatant, presented in phosphate-buffered saline (pH 7.6) with 1% bovine serum albumin carrier protein and containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Ig Class

IgG1, kappa

Total Protein Concentration Total Protein

8.0–12.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 45.0 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:50 for 60 minutes at 25 °C. High temperature antigen retrieval using 0.01 M citrate retrieval solution (pH 6.0) OR trypsin digestion is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the vial label. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.¹ Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.

Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.²

Recommended positive control tissue is endometrium.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody.

Recommended negative control tissue is cerebellum.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.³ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-L-CK7-OVTL last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Results Expected

Normal Tissues

Clone OV-TL 12/30 detects cytokeratin 7 in the cytoplasm of a large number of epithelial cell types including simple, complex, transitional, ductal and glandular epithelium. It consistently stains endometrium, lung alveoli, bile ducts in liver, pancreatic ducts, bronchiolar epithelium, thyroid, distal convoluted tubules and collecting ducts in kidney. Staining was also seen in the glands of the endocervix, bronchus, breast, salivary glands, sweat glands of the skin, myoepithelium (variably), ovarian mesothelium, trophoblasts of the placenta, all cell layers of the urothelium and the surface epithelium of the stomach. Non-epithelial tissues such as smooth muscle, connective tissue, lymphoid tissue and blood vessels were consistently negative.

Abnormal Tissues

Clone OV-TL 12/30 stained 37/40 breast carcinomas. Additionally, staining was seen in 11/12 lung adenocarcinomas, including one bronchiolar carcinoma, 6/6 ovarian carcinomas of various grades and subtypes, 5/5 transitional cell carcinomas of the bladder, 2/2 medullary carcinomas of the thyroid, 2/2 endometrial carcinomas, 1/1 pancreatic adenocarcinoma and 1/1 renal chromophobe carcinoma. No staining was observed with this antibody in small cell lung carcinomas (0/5), squamous carcinomas of the lung (0/7), colonic adenocarcinomas (0/7), melanomas (0/2) or in a variety of other tumors, both benign and malignant (n=42), including adenomas of the colon and adrenal gland, lymphoma, leiomyosarcoma, malignant fibrous histiocytoma, merkel cell tumor, squamous cell carcinomas of non-lung origin, seminomas and GIST.

NCL-L-CK7-OVTL is recommended for use as part of an antibody panel in the differential diagnosis of carcinomas.

General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁴ Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Bibliography - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.

8.14 Anexo 14 - CK 8/18 - 5D3 - Novocastra™

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Cytokeratin (8/18)

Product Code: NCL-L-5D3

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-5D3 is intended for the qualitative identification by light microscopy of Cytokeratin (8/18) molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Clone

5D3

Immunogen

Cytokeratins from the human breast carcinoma cell line MCF-7.

Specificity

Human cytokeratin 8 and 18 intermediate filaments.

Reagent Composition

NCL-L-5D3 is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Ig class

IgG1

Total Protein Concentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 378 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:100 for 60 minutes at 25 °C. Trypsin digestion of paraffin sections is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the vial label. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.¹ Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.

Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.²

Recommended positive control tissue is skin.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. Recommended negative control tissue is cerebellum.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.³ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-L-5D3 last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Results Expected

Normal Tissues

Clone 5D3 detected cytokeratin 8 and 18 in the cytoplasm of all simple glandular and transitional epithelia (n=36). Staining was not seen in normal stratified squamous epithelia from various sites (n=49), apart from the basal cell layer, and a variety of non-epithelial tissues (n=6).

Abnormal Tissues

Clone 5D3 stained 59/60 breast carcinomas, 21/37 cervical intraepithelial neoplasias (CIN) III, 1/22 CIN II, 14/25 carcinomas of the bronchus, 4/4 colon adenocarcinomas, 3/3 bladder carcinomas, 2/2 gastric carcinomas, 1/1 lung adenocarcinoma, 1/1 endometrial adenocarcinoma. Reactivity was also observed with an anaplastic carcinoma of the appendix, the trophoblast of a partial hydatidiform mole, a malignant teratoma of the testis and a peritoneal mesothelioma. It did not stain CIN I (n=22), a variety of lymphomas (n=10), keratinising squamous cell carcinomas (n=7) and mesenchymal lesions (n=5).

NCL-L-5D3 is recommended for use as part of an antibody panel in the identification of adenocarcinomas and most squamous cell carcinomas, but keratinising squamous carcinomas are generally negative.

General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁴ Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Bibliography - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Angus B, Kiberu S, Purvis J et al. Cytokeratins in cervical dysplasia and neoplasia: a comparative study of immunohistochemical staining using monoclonal antibodies NCL-5D3, CAM 5.2, and PKK1. Journal of Pathology. 1988; 155(1):71–75.

8.15 Anexo 15 – Desmina - DER11 - Novocastra TM

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Desmin

Product Code: NCL-L-DES-DERII

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-DES-DERII is intended for the qualitative identification by light microscopy of Desmin molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Clone

DE-R-11

Immunogen

Purified porcine desmin.

Specificity

Human desmin, a 53 kD intermediate filament protein in muscle cells.

Reagent Composition

NCL-L-DES-DERII is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Ig Class

IgG1

Total Protein Concentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 40.5 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:50–1:100 for 60 minutes at 25 °C. Trypsin digestion is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the vial label. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.¹ Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.

Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.²

Recommended positive control tissue is bowel.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody.

Recommended negative control tissues are lymphocytes in tonsil.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.³ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-L-DES-DERII last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Results Expected

Normal Tissues

Clone DE-R-11 detected the intermediate filament protein, desmin, in the cytoplasm of both striated and smooth muscle cells of a variety of normal tissues evaluated (n=86).

Abnormal Tissues

Clone DE-R-11 stained 5/8 rhabdomyosarcomas, 2/2 leiomyomas and 1/1 desmoplastic small round cell tumor. Except for adjacent muscle cells, no staining was seen in a variety of additional tumors evaluated (n=87).

NCL-L-DES-DERII is recommended to aid in the determination of tumors of myogenic origin, such as those arising from smooth muscle and those derived from striated muscle.

General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁴ Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Bibliography - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Katsuta T, Inoue T, Nakagaki H et al. Distinctions between pituitaryoma and ordinary pilocytic astrocytoma. Journal of Neurosurgery. 2003; 98:404-406.
6. Wharton SB, Wardle C, Ironside JW et al. Comparative genomic hybridization and pathological findings in atypical teratoid/rhabdoid tumour of the central nervous system. Neuropathology and Applied Neurobiology. 2003; 29(3):254-261.
7. Barash IA, Peters D, Fridén J et al. Desmin cytoskeletal modifications after a bout of eccentric exercise in the rat. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2002; 283(4):R958-R963.

8.16 Anexo 16 - Ki67 - MM1 - Novocastra TM

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Ki67 Antigen

Product Code: NCL-L-Ki67-MM1

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-Ki67-MM1 is intended for the qualitative identification by light microscopy of Ki67 Antigen molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Clone

MM1

Immunogen

Prokaryotic recombinant fusion protein corresponding to a 1086 bp Ki67 motif-containing cDNA fragment.

Specificity

Human Ki67 nuclear antigen expressed in all proliferating cells during late G1, S, M and G2 phases of the cell cycle.

Reagent Composition

NCL-L-Ki67-MM1 is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Ig Class

IgG1

Total Protein Concentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 72.0 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:100–1:200 for 60 minutes at 25 °C. High temperature antigen retrieval using 0.01 M citrate retrieval solution (pH 6.0) is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the vial label. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.¹ Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.

Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.²

Recommended positive control tissue is tonsil.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. Recommended negative control tissue is cerebellum.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.³ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-L-Ki67-MM1 last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Results Expected

Normal Tissues

Clone MM1 detects the Ki67 antigen in the nucleus of proliferating cells, including those found in the germinal centers and epithelium of tonsil and the crypts of Lieberkühn of the intestine.

Abnormal Tissues

Clone MM1 stained proliferating cell nuclei in a variety of human normal (n=25/28) and neoplastic (n=26/58) tissues. It also stained proliferating cell nuclei in mouse and rat tissues.

NCL-L-Ki67-MM1 is recommended for the assessment of cell proliferation in normal and neoplastic tissues.

General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁴ Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Bibliography - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Corpechot C, Barbu V, Wendum D et al. Hepatocyte growth factor and c-met inhibition by hepatic cell hypoxia. A potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis. American Journal of Pathology. 2002; 160(2):613-620.
6. Suzuki A, Masuda A, Nagata H et al. Mature dendritic cells make clusters with T-cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. Journal of Pathology. 2002; 196:37-43.
7. Crosier M, Scott D, Wilson RG et al. High expression of the trefoil protein TFF1 in interval breast cancers. American Journal of Pathology. 2001; 159(1):215-221.

8.17 Anexo 17 - Receptores de Progesterona - 1A6 - Novocastra TM

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Progesterone Receptor

Product Code: NCL-L-PGR

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-PGR is intended for the qualitative identification by light microscopy of Progesterone Receptor molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Clone

1A6

Immunogen

Synthetic peptide corresponding to a site of predicted high antigenicity on the human progesterone receptor.

Specificity

Human progesterone receptor.

Reagent Composition

NCL-L-PGR is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Ig Class

IgG1

Total Protein Concentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 40.5 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:40 for 60 minutes at 25 °C. High temperature antigen retrieval using 0.01 M citrate retrieval solution (pH 6.0) is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the vial label. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.¹ Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.

Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.²

Recommended positive control tissue is endometrium.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody.

Recommended negative control tissue is tonsil.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.³ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-L-PGR last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Results Expected

Normal Tissues

Clone 1A6 detects progesterone receptor alpha (PGR) antigen in the nuclei of cells that express high levels of the protein, a proportion of endometrial, ovarian and myometrial cells, and normal breast ductal cells.

Abnormal Tissues

Clone 1A6 stained 52/88 breast carcinomas.

NCL-L-PGR is recommended for determining the progesterone receptor alpha status of breast cancer tissue.

General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁴ Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Bibliography - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Kawahara K and Shimazu A. Expression and intracellular localization of progesterone receptors in cultured human gingival fibroblasts. Journal of Periodontal Research 2003 38(3), 242-246.
6. Radzikowska E, Lanfort R and Giedronowicz D et al. Estrogen and progesterone receptors in non small cell lung cancer patients. Ann Thorac Cardiovasc Surg 2002 8(2), 69-73.
7. Blakeman PJ, Hilton P and Bulmer JN et al. Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status. BJU Int 2000 86(1), 32-38.
8. Fernando SS, Wu X and Perera L S. p53 overexpression and steroid hormone receptor status in endometrial carcinoma. International Journal of Surgical Pathology 2000 8(3), 213-222.

8.18 Anexo 18 – Vimentina - V9 - Novocastra TM

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Vimentin

Product Code: NCL-L-VIM-V9

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-VIM-V9 is intended for the qualitative identification by light microscopy of Vimentin molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Clone

V9

Immunogen

Purified vimentin from porcine eye lens.

Specificity

Human vimentin intermediate filament.

Reagent Composition

NCL-L-VIM-V9 is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

Ig Class

IgG1

Total Protein Concentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 54 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:50–1:100 for 60 minutes at 25 °C. High temperature antigen retrieval using 0.01 M citrate retrieval solution is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the vial label. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.¹ Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.

Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.²

Recommended positive control tissue is reactive lymph node.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. Recommended negative control tissue is skeletal muscle.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.³ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products.

They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-L-VIM-V9 last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Results Expected

Normal Tissues

Clone V9 detected the intermediate filament protein, vimentin, in the cytoplasm of cells of mesenchymal origin. Staining was seen in a variety of cell types, including endothelial cells, fibroblasts, smooth muscle cells, myoepithelial cells, peripheral nerve cells, macrophages and lymphoid cells (n=55).

Abnormal Tissues

Clone V9 stained 104/162 tumors evaluated, including sarcomas, lymphomas, renal cell carcinomas, hepatocellular carcinomas, melanomas, rhabdomyosarcomas, leiomyosarcomas and some adeno- and squamous cell carcinomas.

NCL-L-VIM-V9 is recommended for use as part of an antibody panel for the classification of tumors of mesenchymal origin.

General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁴ Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Bibliography - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Katsuta T, Inoue T, Nakagaki H et al. Distinctions between pituitary and ordinary pilocytic astrocytoma. Journal of Neurosurgery. 2003; 98:404-406.
6. Ramos JG, Varayoud J, Kass L et al. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. Endocrinology. 2003; 144(7):3206-3215.
7. Reis A, Kuzeyli K, Cobanoglu et al. Pilocytic astrocytoma of neurohypophysis. Neuropathology. 2003; 23(3):214-218.



Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Alpha Fetoprotein

Product Code: NCL-AFP

Intended Use	FOR RESEARCH USE ONLY.
Specificity	Human alpha fetoprotein. Also reacts with pig and dog alpha fetoprotein. Does not react with mouse, rat, cat or cow alpha fetoprotein.
Clone	C3
Ig Class	IgG2a
Antigen Used for Immunizations	Affinity isolated alpha fetoprotein from serum of a hepatoma patient.
Hybridoma Partner	Mouse myeloma (P3-X63.Ag8.653).
Preparation	Lyophilized tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide. Reconstitute with the volume of sterile distilled water indicated on the vial label.
Effective on Frozen Tissue	Yes
Effective on Paraffin Wax Embedded Tissue	Yes
Recommendations on Use	Immunohistochemistry: Typical working dilution 1:50. 60 minutes primary antibody incubation at 25 °C. Standard ABC technique. Western Blotting: Not evaluated.
Positive Controls	Immunohistochemistry: Fetal liver.
Staining Pattern	Cytoplasmic
Storage and Stability	Store unopened lyophilized antibody at 4 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 4 °C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the antibody are frozen at -20 °C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use.
General Overview	Alpha fetoprotein (AFP) is an oncofetal antigen of 70 kD found in body fluids. AFP is expressed in fetal liver, but is not present in adult tissues.
General References	Yazova A K, Goussev A I, Poltoranina V S, et al.. Immunology Letters. 25 (4): 325–330 (1990).



8.20 Anexo 20 – DAB Substrate Kit for Peroxidase



DAB SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE

Catalog Number SK-4100

The DAB substrate kit contains all of the reagents necessary to prepare a working solution of 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) for staining tissue sections or for nitrocellulose, nylon, or other membranes. DAB will yield a brown stain. If nickel chloride is added to the substrate solution, a gray-black stain will result.

DISPENSING REAGENTS:

For convenience, the reagents are supplied in dropper bottles. When dispensing drops, hold the bottle in an inverted vertical position and squeeze gently. To prevent evaporation, secure the opaque caps on the bottles when they are not in use. **DO NOT PIPET REAGENTS DIRECTLY FROM BOTTLES.**

Drop volumes of each component may be different due to solvent characteristics. Proper concentrations of substrate components are assured in preparing the working solutions by using the drop dispensers only.

INSTRUCTIONS FOR:

Use in Immunohistochemical Staining

Immediately before use, prepare the substrate solution as follows.

1. To 5.0 ml of **distilled** water, add 2 drops of Buffer Stock Solution and mix well.
2. Add 4 drops of DAB Stock Solution and mix well.
3. Add 2 drops of the Hydrogen Peroxide Solution and mix well.
4. If a gray-black stain is desired, add 2 drops of the Nickel Solution and mix well.

Incubate tissue sections with the substrate at room temperature until suitable staining develops. Development times should be determined by the investigator but generally 2-10 minutes provides good staining intensity.

Wash the sections for 5 minutes in water.

Counterstain and mount. Coverslip with either a permanent mounting media (such as *VectaMount™*, H-5000) or an aqueous-based mounting media (such as *VectaMount™* AQ, H-5501).

Use in Membrane Staining

For nitrocellulose or nylon membranes, use up to 15 ml of distilled water and follow steps 1-4 above. Transfer membrane to a separate staining vessel *which has not been exposed to peroxidase*, containing a suitable volume of DAB substrate solution. Development time is generally 10-20 minutes at room temperature. When development is satisfactory, wash membrane in water for 5 minutes and air dry.

NOTES:

We recommend using glass-distilled water in the preparation of substrate buffer. Deionized water may contain inhibitors of the peroxidase reaction.

Variations in color intensity of the stock and working solutions may be seen between lots of this product. These variations will not affect the product stability or the intensity of the staining. The working solution remains stable for up to six hours when stored at 4 °C.

The reagents in the substrate kit should be stored at 4 °C and protected from light whenever possible.

The DAB reaction product can be intensified using a DAB Enhancing Solution, Cat. No. H-2200, after development. It is recommended that this Enhancing Solution be used after the DAB substrate solution *without nickel*.

IMPORTANT: DAB and nickel chloride are suspected carcinogens. Appropriate care should be exercised when using these reagents including gloves, eye protection, lab coats, and good laboratory procedures. Dispose in accordance with local regulations.

6/11

Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010 U.S.A.
Tel: (650) 697-3600 • Fax: (650) 697-0339 • Email: vector@vectorlabs.com • Web site: www.vectorlabs.com