

# Processamento tecidual para análise imunoistoquímica de receptores hormonais em carcinoma mamário: dois momentos em um laboratório de anatomia patológica; correlação dos resultados com método bioquímico

*Tissue processing for hormone receptor immunohistochemistry in breast cancer: two moments in a pathology laboratory; correlation of results with a biochemical assay*

Victor Arias<sup>1</sup>  
Pedro Luiz Mazza<sup>2</sup>  
Marcelo Antonio Aranha Funke<sup>2</sup>

Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 223-228, 2003

223

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

unitermos	resumo
Câncer da mama/patologia	A reação imunoistoquímica é altamente dependente da fixação e da preparação histológica do tecido. Nós comparamos os resultados da pesquisa de receptores de estrógeno e de progesterona no câncer mamário utilizando um método bioquímico e um método imunoistoquímico em relação ao tipo de processamento histológico, no forno de microondas ou na estufa. O grupo de casos cujos tecidos foram processados no forno de microondas não apresentou correlação entre os dois métodos ( $p = 0,098$ para o receptor de estrógeno; $p = 0,5$ para o receptor de progesterona). Houve boa correlação entre os métodos nos tecidos processados na estufa ( $p = 0,0447$ e $Q = 0,76$ para o receptor de estrógeno; $p = 0,0472$ e $Q = 0,764$ para o receptor de progesterona). Concluímos que a pesquisa de receptores hormonais por reação imunoistoquímica no câncer mamário é uma realidade, apresentando bons resultados desde que sejam tomados cuidados na fixação e no processamento e que sempre sejam utilizados controles externos adequados à realidade de cada laboratório.
Imunoistoquímica/métodos	
Marcadores bioquímicos	
de tumor/análise	
Receptores hormonais nucleares	

## abstract key words

*Immunohistochemistry is highly dependent on tissue fixation and histologic processing. We compared the results of estrogen and progesterone receptor quantitation determined by using both a biochemical method and an immunohistochemical method related with tissue preparation, either in the microwave oven or in the stove. The group of cases whose tissues were processed in the microwave oven did not present statistical correlation between the methods ( $p = 0,098$  to estrogen receptor;  $p = 0,5$  to progesterone receptor). There was good correlation between the methods in tissues which were processed in the stove ( $p = 0,0447$  and  $Q = 0,76$  for estrogen receptor;  $p = 0,0472$  and  $Q = 0,764$  for progesterone receptor). We conclude that immunohistochemistry for hormone receptors in breast cancer is a reality. It is feasible since some cautions are taken in the fixation and processing. External controls appropriated to the reality of a given laboratory should always be used.*

Breast cancer/pathology  
Immunohistochemistry/methods  
Cytosol assay  
Hormone receptors

## Introdução

A importância que a detecção dos receptores hormonais tem adquirido na prática clínica para a condução de casos de câncer mamário está relacionada tanto ao valor preditivo para resposta a terapia endócrina quanto ao seu valor prognóstico. Pacientes com tumores que expressam receptores hormonais tendem a

apresentar melhor resposta à terapia anti-hormonal e maior sobrevida, tanto livre de doença, quanto global (6, 11).

O método de detecção de receptores hormonais no tecido neoplásico deve ser, então, seguro, altamente reprodutível e clinicamente relevante (8). Métodos bioquí-

1. Médico do Instituto de Patologia Cardoso de Almeida e do Instituto Adolfo Lutz; mestre em Patologia Humana pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP; doutor em Ciências, área de oncologia, pela Fundação Antônio Prudente.  
2. Médico do Serviço de Mastologia do Hospital Evaldo Foz. Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Cardoso de Almeida e no Laboratório Criesp.

micos de detecção dos receptores hormonais carregam a vantagem de trabalhar com resultados quantitativos, mas têm como desvantagem dependerem de tecido fresco e não se apoiarem na morfologia da lesão (5, 8), uma vez que a amostra representada pelo homogeneizado tecidual pode conter, além de células neoplásicas, células estromais e células do epitélio não-neoplásico. Métodos de detecção *in situ*, como a imunoistoquímica, podem ser realizados em material de arquivo, fixado em formol e incluído em parafina, utilizando-se a morfologia tecidual para detectar células neoplásicas positivas, mas os resultados são qualitativos e não indicam se a proteína marcada é funcional ou não (5, 8).

O método imunoistoquímico, principalmente após o desenvolvimento de anticorpos capazes de reconhecer epitopos que não se degradam durante o processamento histológico, tem, na prática, gradativamente, substituído o método bioquímico, antes tido como o padrão-ouro, para a avaliação dos receptores hormonais (6, 8, 9). Os resultados do método imunoistoquímico dependem de variáveis como o tipo de fixador utilizado, o tempo de fixação do material, a temperatura de processamento e o método de recuperação antigênica utilizado (2, 7). À exceção do último, os outros nem sempre podem ser padronizados, pois são procedimentos que ocorrem à distância do laboratório de patologia ou, então, variam de laboratório para laboratório.

O presente trabalho tem dois objetivos. O primeiro, comparar os resultados obtidos na pesquisa de receptores de estrógeno e de progesterona no câncer mamário utilizando um método bioquímico e um método imunoistoquímico. O segundo, utilizando o método bioquímico como padrão-ouro, verificando a confiabilidade do método imunoistoquímico em relação ao tipo de processamento histológico. Para tal, utilizamos material de arquivo coletado em duas épocas diferentes no que diz respeito a tais variáveis em nosso laboratório.

## Material e métodos

Foram estudados 44 carcinomas mamários de mulheres operadas no Setor de Mastologia do Hospital Evaldo Foz (São Paulo) entre 1993 e 1999. Estes foram categorizados segundo a data da coleta do material em grupo A, coleta no período de 1993 a 1995 (18 casos), e grupo B, coleta nos anos de 1996 a 1999 (26 casos). Durante o ato cirúrgico era realizado exame peroperatório pelo método de congelação, no qual, além do diagnós-

tico, o patologista escolhia um fragmento constituído exclusivamente por tecido neoplásico para pesquisa de receptores de estrógeno e progesterona por método bioquímico. Este fragmento de aproximadamente 0,5cm<sup>3</sup> era, então, congelado em nitrogênio líquido para preparação do citossol. O restante do material e a peça cirúrgica correspondente eram fixados em formol a 10% por um período que variava de 12 a 36 horas e seguiam para processamento histológico. O material do grupo A foi processado de acordo com as recomendações de Boon e Kok (3), utilizando-se um forno de microondas convencional (marca Sharp, modelo MW620A), com potência de 700W e tempo e temperatura ajustáveis (Tabela 1). O material do grupo B foi processado a quente em estufa convencional (Tabela 2).

O fragmento congelado em nitrogênio líquido era enviado à Central de Imunoensaio de São Paulo (Criesp), onde o tecido era pulverizado para a obtenção do citossol. Então, a pesquisa de receptores de estrógeno e progesterona era realizada pelo método do carvão-dextrano, como previamente descrito (4). Níveis maiores ou iguais a 10 femtomoles/mg foram considerados positividade para receptor de estrógeno. Para serem considerados positivos para receptor de progesterona, os níveis deveriam ser de 20 femtomoles/mg ou maiores.

Os blocos de parafina arquivados no Laboratório de Patologia Cardoso de Almeida (São Paulo) foram recuperados para a reação imunoistoquímica. Tomamos o cuidado de escolher amostras que não foram submetidas ao exame de congelação peroperatório. Os cortes histológicos de tecido mamário foram montados em lâminas previamente sinalizadas (3-aminopropiltriétoxissilano, marca Sigma). Após desparafinização e reidratação, foram imunocorados utilizando-se o método do complexo streptavidina-biotina-peroxidase (*kit* LSAB+, Dako).

**Método de processamento tecidual em forno de microondas utilizado no Laboratório de Patologia Cardoso de Almeida no período de 1993 a 1995**

**Tabela 1**

Banho	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Formol a 10%	10	55
Álcool absoluto	10	55
Álcool absoluto	15	62
Xilol	5	77
Parafina	20	65

**Método de processamento tecidual em estufa convencional utilizado no Laboratório de Patologia Cardoso de Almeida no período de 1996 a 1999**

**Tabela 2**

Banho	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Álcool absoluto	20	70
Xilol	10	70
Xilol	10	70
Parafina	30	62
Parafina	30	62

O bloqueio da peroxidase endógena foi alcançado lavando-se as lâminas com água oxigenada a 3%, e a recuperação antigênica, por calor úmido em panela a vapor (*steamer*) por 60 minutos em tampão citrato 10mM, pH 6. Os anticorpos primários utilizados foram o anti-receptor de estrógeno (clone 1D5, monoclonal, Dako) diluído a 1/100 e o anti-receptor de progesterona (clone 1A6, monoclonal, Dako) diluído a 1/200. Para controle positivo utilizamos amostras de carcinoma endometrial sabidamente positivas para os marcadores pesquisados e processadas de maneira semelhante às amostras de carcinoma mamário em teste. Para controle negativo, substituímos o anticorpo primário por solução salina tamponada (PBS). À avaliação dos resultados, aceitamos como positivas as reações nos tecidos em que havia pelo menos 5% dos núcleos marcados (6).

Para estudar os resultados estatisticamente, isto é, para verificar se há concordância entre os métodos utilizados, no mesmo indivíduo, em cada um dos grupos, utilizamos o teste exato de Fisher. Para verificarmos a magnitude e o sinal da associação utilizamos o coeficiente de associação de Yule (Q).

## Resultados

A reação imunohistoquímica, quando positiva, tanto para o receptor de estrógeno quanto para o receptor de progesterona, corou os núcleos celulares. Geralmente havia um número bem maior que os 5% de núcleos positivos requeridos para diagnóstico de positividade. No grupo A (casos coletados no período de 1993 a 1995), notamos que os cortes tendiam a descolar das lâminas e

as amostras apresentavam artefatos de corte como o aspecto em *veneziana*, causado por trepidação do bloco de parafina no suporte do micróto. Provavelmente este artefato foi causado pela consistência endurecida do tecido emblocado. Houve variações na intensidade da reação dentro de um mesmo corte, produto de fixação irregular do material. Quando comparamos as várias reações, pudemos verificar também alta variabilidade na intensidade de caso para caso. Ao comparamos as reações para os diferentes marcadores, percebemos que os resultados para o receptor de estrógeno foram mais consistentes, isto é, mais homogêneos de caso para caso (Figura 1).

No grupo B (casos coletados entre 1996 e 1999), verificamos menor tendência de descolamento dos cortes histológicos e os artefatos praticamente não existiram, obtendo-se, assim, morfologia perfeita, mesmo após a prolongada exposição ao calor úmido na câmara a vapor. Também verificamos que as reações, além de mais homogêneas, deram resultados mais consistentes com intensidade maior e mais homogênea pelo corte histológico. Quando comparamos com os resultados das reações para receptor de estrógeno com as realizadas para pesquisa de receptor de progesterona, verificamos que as últimas apresentavam intensidade menor, assim como um número menor de núcleos marcados (Figura 2).

A distribuição dos resultados referentes às reações imunohistoquímicas e às pesquisas dos receptores hormonais pelo método do carvão-dextrano estão expostas nas Tabelas 3 e 4. Brevemente, no grupo A, para o receptor de estrógeno, houve coincidência de resultados positivos em dois casos, de resultados negativos em 12 casos e disparidade de resultados em quatro casos. Tais resultados mostraram independência estatística entre os dois métodos ( $p = 0,098$ ). No grupo B, houve coincidência de

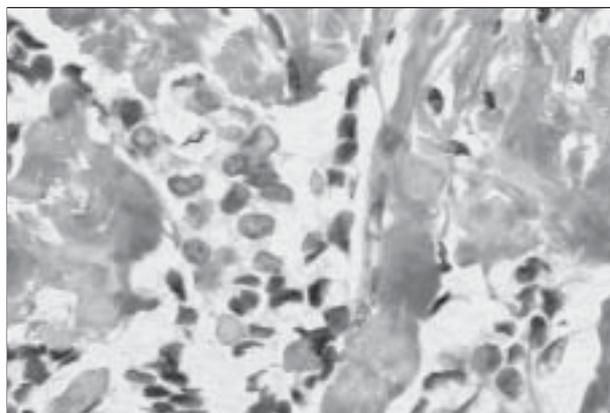


Figura 1 – Reação imunohistoquímica para pesquisa de receptor de estrógeno (anticorpo 1D5) em material processado histologicamente em forno microondas

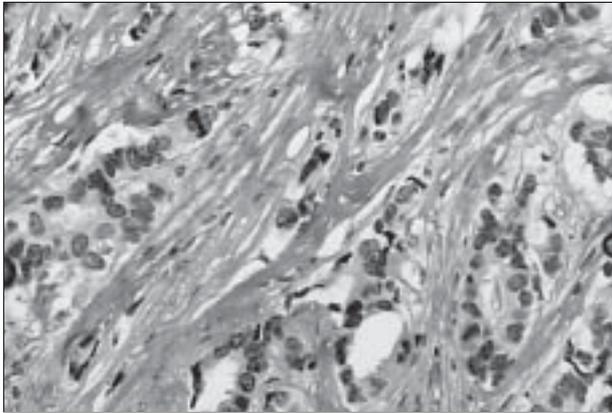


Figura 2 – Reação imunoistoquímica para pesquisa de receptor de estrógeno (anticorpo 1D5) em material processado histologicamente em estufa

resultados positivos em 11 casos e de resultados negativos em oito casos e disparidade de resultados em sete casos. Tais resultados mostraram associação estatística entre os dois métodos ( $p = 0,0447$ ). No grupo A, para o receptor de progesterona, houve coincidência de resultados positivos em dois casos e de resultados negativos em oito casos e disparidade de resultados em oito casos. Tais resultados mostraram independência estatística entre os dois métodos ( $p = 0,5$ ). No grupo B, houve coincidência

de resultados positivos em nove casos e de resultados negativos em dez casos e disparidade de resultados em sete casos. Tais resultados mostraram associação estatística entre os dois métodos ( $p = 0,0472$ ). O índice de associação de Yule demonstrou boa associação estatística entre os dois métodos no grupo B, tanto para o receptor de estrógeno ( $Q = + 0,76$ ) quanto para o receptor de progesterona ( $Q = + 0,764$ ).

## Discussão

A pesquisa de receptores de estrógeno e progesterona passou a ter papel importante no acompanhamento de pacientes com câncer de mama devido ao seu valor preditivo à resposta terapêutica anti-hormonal. Pacientes com tumores que expressam ambos os marcadores têm um índice de resposta ao tratamento com tamoxifeno de 78%, enquanto que aquelas com expressão negativa destes receptores hormonais apresentam um índice de resposta terapêutica de 10% (1).

Esses receptores hormonais podem ser pesquisados tanto por métodos bioquímicos quanto por métodos

**Freqüência dos resultados obtidos nos grupos A e B para pesquisa de receptor de estrógeno (grupo A, processamento histológico em forno de microondas, período de 1993 a 1995; grupo B, processamento histológico a quente em estufa convencional, período de 1996 a 1999)**

**Tabela 3**

Carvão-dextrano	Imunoistoquímica				Total
	Grupo A		Grupo B		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Positivo	2	0	11	4	17
Negativo	4	12	3	8	27
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>44</b>

**Freqüência dos resultados obtidos nos grupos A e B para pesquisa de receptor de progesterona (grupo A, processamento histológico em forno de microondas, período de 1993 a 1995; grupo B, processamento histológico a quente em estufa convencional, período de 1996 a 1999)**

**Tabela 4**

Carvão-dextrano	Imunoistoquímica				Total
	Grupo A		Grupo B		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Positivo	2	1	9	4	16
Negativo	7	8	3	10	28
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>44</b>

morfológicos como a imunohistoquímica. Após o desenvolvimento de anticorpos que reconhecem epitopos dos receptores hormonais com segurança, em material fixado em formol a 10% e fixados em parafina, houve uma tendência a substituir o método bioquímico pelo imunohistoquímico. O custo e a complexidade do método bioquímico são fatores que contribuíram para esta decisão. Ainda, deve-se levar em consideração que o método bioquímico necessita de grandes amostras de tecido, havendo restrições em tumores de diâmetro menor que 1 cm.

As desvantagens do método imunohistoquímico residem especialmente na variabilidade de resultados tanto interobservador quanto interlaboratorial. O método resente-se da falta de padronização tanto da reação em si, na qual são utilizados, para o mesmo fim, clones diferentes de anticorpos, diferentes métodos de fixação, de recuperação antigênica e métodos de amplificação da reação, quanto da padronização de expressão dos resultados, havendo diferentes sistemas, como a obtenção de escores segundo o número de núcleos marcados e sua intensidade, ou então simplesmente relatando uma proporção de núcleos positivos tanto por um sistema de cruzes quanto por um de porcentagem estimada, ou contagem real por unidade de área. Neste trabalho, escolhemos quantificar por estimativa do número de núcleos marcados, utilizando um *cut-off* de 5%, já que nos interessava apenas categorizar qualitativamente os resultados em positivos e negativos.

O foco deste trabalho, além da comparação entre os métodos bioquímico e imunohistoquímico, está na avaliação do processamento histológico. Tentamos, na medida do possível, eliminar as demais variáveis. A fixação permaneceu a mesma, utilizando-se formol a 10% produzido da mesma forma nos seis anos em que o material foi coletado. O tempo de fixação variou de 12 a 36 horas. Todas as reações imunohistoquímicas foram realizadas em um só tempo, ficando todas as lâminas expostas às mesmas condições de trabalho. Todas as reações foram avaliadas de uma vez para evitarmos vieses de interpretação.

Assim, comparamos dois tipos de processamento histológico a quente, isto é, que utiliza banhos com temperatura aumentada com a intenção de se diminuir o tempo de processamento. Boon e Kok (3) estabeleceram as bases do processamento em forno de microondas. A maioria dos materiais assim processados, quando corados pela hematoxilina e pela eosina, não apresentou diferenças morfológicas importantes. A nossa experiência, porém, revelou que alguns tecidos ricos em colágeno, quan-

do submetidos a alterações bruscas de temperatura dos banhos durante o processamento, podem sofrer desidratação além da desejada e tornar-se mais duros e difíceis de serem cortados à microtomia. Este é o caso de tumores mamários que na maioria das vezes apresentam algum grau de reação desmoplásica. É importante salientar que, dadas as características do forno de microondas por nós utilizado, tínhamos a possibilidade de controlar tanto a temperatura quanto o tempo de cada banho e, assim, garantir que nenhum material foi submetido a uma temperatura acima da qual há degradação dos antígenos. Mesmo assim, verificamos que os resultados da reação imunohistoquímica do material assim processado não foram tão satisfatórios, com heterogeneidade e baixa intensidade de imunocoloração. Estes resultados causaram, até certo ponto, alguma surpresa, desde que, historicamente, a idéia de se submeter lâminas ao calor úmido em forno de microondas para recuperação antigênica em tampão tiocianato de chumbo nasceu da observação de que tecidos submetidos ao processamento histológico no forno de microondas coravam-se melhor à imunohistoquímica do que aqueles que sofriam processamento convencional (10).

Quando estudamos os resultados da pesquisa de receptores hormonais pelo método imunohistoquímico, utilizando os resultados do método bioquímico como padrão-ouro, verificamos que não há diferença estatística entre os resultados desses métodos quando utilizamos o processamento histológico a quente em estufa convencional ( $p = 0,447$ ;  $Q = + 0,76$  para o receptor de estrógeno e  $p = 0,0472$ ;  $Q = + 0,764$  para o receptor de progesterona). Mesmo assim, notamos resultados discrepantes, positivos no método bioquímico e negativos no método imunohistoquímico e vice-versa. Gordts *et al.* (5) encontraram diferenças de até 23% entre os dois métodos. Kell *et al.* (7) tentaram especular sobre as possíveis fontes de diferenças, embora tenha havido casos sem que se encontrassem explicações plausíveis. No nosso caso não podemos considerar falso positivo no método bioquímico por amostragem errônea, já que o exame peroperatório por congelamento evitou o viés de se incluir tecido não-neoplásico para exame, fato que se confirmou após se ter incluído o tecido controle em parafina.

Finalmente, devemos considerar com o exposto que a pesquisa de receptores hormonais por reação imunohistoquímica no câncer mamário é uma realidade e apresenta bons resultados. É importante chamar a atenção, no entanto, para o fato de que no primeiro período

estudado houve excessivo número de resultados negativos para o método bioquímico. É possível que isso tenha se devido a resultados falsos negativos, provavelmente decorrentes do pequeno tamanho da amostra enviada para o laboratório. Chamamos a atenção para o fato de que a padronização do método deve ser iniciada logo à fixação do material no centro cirúrgico com treinamento adequado do pessoal de enfermagem, passando pelo processamento histológico e finalizando com o exame

criteroso dos resultados das reações, utilizando-se para tal tanto controles externos confiáveis como o controle interno positivo. A escolha dos controles externos deve residir não somente na positividade da reação, mas também no tipo de fixação e no processamento do material, que devem ser semelhantes ao do tecido em estudo, desta forma protegendo o patologista de possíveis erros de avaliação secundários a má fixação e artefatos de processamento do material.

## Referências

1. [Anonymous]. Steroid receptors in breast cancer: an NIH Consensus Development Conference, Bethesda, Maryland, June 27-29, 1979. *Cancer*, 46(12 suppl.): 2759-963, 1980.
2. Arias, V.E.A. et al. Imunoistoquímica aplicada ao diagnóstico: 1. Encaminhamento de peças do centro cirúrgico ao laboratório de patologia. *Medicina*, 28: 39-43, 1995.
3. Boon, M.A. & Kok, L.P. *Microwave cookbook of pathology: The art of microscopic visualization*. Leiden: Coulomb Press Leyden, 1987.
4. Brentani, M.M.; Nagai, M.A. & Goes, J.C.S. Steroid receptors in a group of Brazilian breast cancer patients. *J. Surg. Oncol.*, 18(4): 431-9, 1981.
5. Gordts, S.L. et al. The immunocytochemical versus cytosomeasurement of the oestrogen receptor in invasive breast cancer tissue. *Eur. J. Cancer*, 36: S20-S21, 2000.
6. Harvey, J.M. et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1474-81, 1999.
7. Kell et al. Immunohistochemical analysis of breast carcinoma estrogen and progesterone receptors in paraffin-embedded tissue: correlation of clones ER1D5 and 1A6 with a cytosol-based hormone receptor assay. *Appl. Immunohistochem.*, 1: 275-81, 1993.
8. Leake, R. detection of the oestrogen receptor (ER): immunohistochemical versus cytosol measurements. *Eur. J. Cancer*, 36: S18-S19, 2000.
9. Lohmann, C. et al. Progesterone receptor immunohistochemical quantitation compared with cytosolic assay: correlation with prognosis in breast cancer. *AIMM*, 9: 49-53, 2001.
10. Shi, S.R.; Key, M.E. & Kalra, K. L. 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.*, 39(6): 741-8, 1991.
11. Wiltliff, J. L. Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 53(3 suppl.): 630-43, 1984.

### Endereço para correspondência

Victor Arias  
Rua Conselheiro Brotero 1.505/8º andar  
Santa Cecília  
CEP 01232-011 – São Paulo-SP  
Tel.: (11) 3826-3400  
e-mail: varias@cardosodealmeida.com.br