



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

**MARINA FERRAZ CORDEIRO**

**PERFIL DO HER-2 NO DIAGNÓSTICO  
IMUNOHISTOQUIMIOLUMINESCENTE DO CARCINOMA DUCTAL  
INVASIVO MEDIANTE O EMPREGO DE ANTICORPO CONJUGADO AO  
ÉSTER DE ACRIDINA.**

**Recife**

**2012**

**MARINA FERRAZ CORDEIRO**

**PERFIL DO HER-2 NO DIAGNÓSTICO  
IMUNOHISTOQUIMIOLUMINESCENTE DO CARCINOMA DUCTAL  
INVASIVO MEDIANTE O EMPREGO DE ANTICORPO CONJUGADO AO  
ÉSTER DE ACRIDINA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

**ORIENTADOR:**

**Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**

**Recife**

**2012**

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

C794p Cordeiro, Marina Ferraz

Perfil do Her-2 no diagnóstico imunohistoquimioluminescente do carcinoma ductal invasivo mediante o emprego de anticorpo conjugando ao éster de acridina / Marina Ferraz Cordeiro. – Recife: O Autor, 2012.

53 folhas: il., fig.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2012.  
Inclui referências e anexos.

1. Mamas – Câncer 2. Câncer – Diagnóstico I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orientador) II. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-312

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

## **Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde**

### **REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

### **VICE-REITOR**

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

### **PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

### **DIRETOR DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI**

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

### **COORDENAÇÃO ADMINISTRATIVA DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Carmo Pimentel

### **COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CORDEIRO, Marina Ferraz.

Título: Perfil Do HER-2 no Diagnóstico Quimioluminescente do Carcinoma Ductal Invasivo Mediante o Emprego de Anticorpo Conjugado ao Éster de Acridina.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.

Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*À minha filha amada Maria Luísa e aos meus queridos pais Thales e Lucia, por todo amor, carinho, gratidão e apoio que me deram para que eu completasse mais essa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter sempre me guiado a seguir o caminho certo, buscando me explicar o sentido da vida, me abençoando e me colocando à frente de pessoas tão maravilhosas quanto às que tive oportunidade de conhecer durante esse tempo.

À minha filha querida, minha princesa Maria Luísa, pela força que achei em você de querer ser o que eu sou neste momento. Obrigado por estar aqui comigo hoje e sempre, minha vida, meu verdadeiro e mais puro amor, TE AMO! Foi e será sempre por você, MINHA PRINCESA!

Ao meu orientador Eduardo Beltrão por ter me acolhido, depositado em mim toda confiança, por estar sempre comigo nos momentos de amizade, de aflição, por compreender minhas limitações e por estar presente numa das fases mais especiais da minha vida. Muito obrigado por tudo!

Agradeço de uma forma mais que especial (sem palavras...) ao meu eterno orientador, amigo Moacyr Rêgo que me recebeu dentro do laboratório de uma forma muito carinhosa e amiga desde o começo. Obrigado por todos os momentos especiais que vivi ao teu lado, por todos os ensinamentos e por todas as horas em que te aperreei.

Aos meus Pais Thales e Lucia, pessoas tão simples, porém de tamanha importância para mim. Minha eterna gratidão por todos os dias de minha vida, pelo apoio, amor, carinho, compreensão... Amo vocês!

Não poderia deixar de agradecer à minha irmã Renata pela força, amor, por suas palavras sinceras nos momentos em que mais precisei. E aos meus segundos Pais, meu Avô Oswaldo (*Que hoje descansa em paz, ao lado de Deus*) e à minha Avó Alda, iniciadores das minhas lições, aos quais eu sinto profundo orgulho, agradecimento, e amor.

Aos meus familiares Tia Clara e Dudu que sempre procuravam saber como andavam meus experimentos.

Aos meus eternos e verdadeiros amigos que estiveram e estarão sempre comigo para tudo. Esther Mendonça, Sandra Mendonça, Layse Malagueta, Fátima Lima, Tiago Araújo, Marcela Melo, Lídio Cosme, Ana Karla Barreto, Suany Melo. Meus amigos, obrigado pelo

carinho, pelas palavras de conforto, por todos os momentos que vivi ao lado de vocês até hoje.

A toda equipe dos Setores de Patologia e de Bioquímica do LIKA que me ajudou a desenvolver esse trabalho, dando total apoio. Todos aqueles que fazem parte do BmC e IMOBIO, em especial a Sinara Almeida e Luiza Rayana gostaria de dividir minha felicidade com vocês neste momento (novamente, sem palavras pra agradecer...).

## RESUMO

A quimioluminescência (QL) destacou-se nas últimas décadas por indicar resultados satisfatórios em pesquisas de diagnóstico para algumas neoplasias. Desta maneira, a QL foi aplicada na quantificação dos resultados fornecidos pela imunohistoquímica (IHq) para a proteína HER-2, expressa em altos níveis em células neoplásicas de mama humana, conjugada à Éster de Acridina (EA). Este estudo objetivou a obtenção do conjugado anti-HER-2-EA e a avaliação do reconhecimento deste complexo no carcinoma ductal invasivo mamário (CDI). Cinquenta amostras de CDI, obtidas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), foram submetidas à técnica de IHq utilizando o método da estreptavidina-biotina-peroxidase, e imunoquimioluminescência com HER-2. Durante ensaio quimioluminescente o tecido foi incubado com o conjugado e com tampão fosfato 10 mM pH 7,2 como controle negativo. O resultado foi expresso em unidades relativas de luz (URL). A IHq das amostras indicou sete amostras positivas (3+), cinco indeterminadas (2+) e trinta e oito negativas (0 ou 1+). A análise quimioluminescente forneceu resultados significantes, onde os casos 3+ obtiveram maior URL ( $246.982 \times 10^3 \pm 2.061 \times 10^3$ ) em comparação aos casos 2+ ( $76.146 \times 10^3 \pm 0.290 \times 10^3$ ), negativos ( $27.415 \times 10^3 \pm 1.445 \times 10^3$ ) e controles normais ( $27.064 \times 10^3 \pm 2.060 \times 10^3$ ). O conjugado anti-HER-2-EA foi eficiente na avaliação de tumor maligno de mama, em níveis diferentes de expressão de HER-2, possibilitando a sua quantificação e por consequência diminuindo a subjetividade do diagnóstico o que permite uma abordagem diferenciada para o diagnóstico do carcinoma ductal invasivo.

Palavras-chave: quimioluminescência, carcinoma ductal invasivo, HER-2.

## ABSTRACT

Chemiluminescence is a technique that has been highlighted in recent decades, where satisfactory results were observed in diagnostics research of some cancers. CL was applied to quantify the immunohistochemistry of HER-2 protein, expressed at high levels in human breast cancer cells, conjugated to Acridinium Ester (AE). Thus this study aimed to obtain the conjugate anti-HER-2-EA and evaluate the recognition assessment of this immune complex in the diagnosis of invasive ductal carcinoma of human breast. Fifty IDC samples obtained from the Clinical Hospital at Federal University of Pernambuco were submitted to IHC using the streptavidin-biotin-peroxidase method and immunochemiluminescence with anti-HER-2-AE. Results were expressed in Relative Lights Units. IHC showed seven positive samples (3+), five indeterminate (2+) and thirty-eight negative (0 or 1 +). CL analysis provided significant results, where 3+ cases presented the highest RLU ( $246,982 \times 10^3 \pm 2.061 \times 10^3$ ) compared to 2+ cases ( $76,146 \times 10^3 \pm 0.290 \times 10^3$ ), negative ( $27,415 \times 10^3 \pm 1.445 \times 10^3$ ) and normal controls ( $27,064 \pm 2.060 \times 10^3 \times 10^3$ ). The conjugate anti-HER-2-AE was effective to evaluate a human mammary tumor, presenting different HER-2 expression profile, allowing its quantitative evaluation and as consequence decreasing the subjectivity in diagnosis leading to a differential approach in invasive ductal carcinoma.

Key-words: chemiluminescence, invasive ductal carcinoma, HER-2.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estágios do crescimento anormal de populações celulares mamárias normais até o câncer invasivo. (VELASCO <i>et al.</i> , 2008).....	16
Figura 2: Marcos do câncer (HANAHAN E WEINBERG (2000)).....	16
Figura 3: Adição de mais três elementos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer (Hanahan & Weinberg, 2011).....	17
Figura 4: Anatomia da mama contendo seus ductos e lóbulos. (VALESCO <i>et al.</i> , 2008).....	19
Figura 5: Comparação entre os ensaios imunohistoquímicos e quimioluminescentes (ARAÚJO-FILHO, MELO-JÚNIOR & CARVALHO JR, 2011).....	24

### ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1: Anti-HER-2-AE elution profile from Sephadex G-25 column (10x1).....	40
Figure 2: Immunohistochemistry and Chemiluminescence in IDC labeled with anti-HER-2-EA. Statistical analysis of RLU (mean of triplicate) of 0/1+, 2+ (n=5) and 3+ (n=7) patients.....	41
Figure 3: Relationship between 1+ ( $r^2 = 0.9517$ ) and 2+ ( $r^2 = 0.9743$ ) patients where is observed a linear regression (A). Exponential relation for 3+ patients (B).....	43

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AE	Do inglês <i>Acridinium Ester</i>
Anti-HER-2	Anticorpo HER-2
Anti-HER-2-EA	Anticorpo conjugado ao Éster de Acridina
ASCO	American Society of Clinical Oncology
CAP	Colégio Americano de Patologistas
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CL	Quimiluminescência do inglês <i>Chemiluminescence</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Con A	Concanavalin A
DAB	Diaminobenzidina
EA	Éster de Acridina
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente do inglês <i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
HC-PE	Hospital das Clínicas de Pernambuco
HER-2	Fator de crescimento epidermal humano 2 do inglês <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IARC	International Agency for Research on Cancer
IHC	Imunohistoquímica do inglês <i>Immunohistochemistry</i>
IHq	Imunohistoquímica
kDa	Quilo Dalton
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
QL	Quimioluminescência
RLU	Unidades relativas de luz do inglês <i>Relative Lighths Units</i>
RPM	Rotações por minuto
SISNEP	Sistema Nacional de Ética em Pesquisa
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Câncer: Uma visão geral.....	15
2.2 Câncer de mama e o Oncogene HER-2.....	18
2.3 Quimioluminescência.....	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo Geral.....	30
4.2 Objetivos Específicos.....	30
5. METODOLOGIA.....	30
5.1 Caracterização do Estudo.....	30
5.2 População e Amostras Clínicas.....	30
5.3 Imunohistoquímica.....	31
5.4 Conjugação Anti-HER-2 – EA.....	31
5.5 Preparação Histológica e Reação Quimioluminescente.....	31
5.6 Análise Estatística.....	32
6. ARTIGO CIENTÍFICO.....	33
7. CONCLUSÕES.....	49
8. ANEXO.....	50

## 1. INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas grandes avanços quanto o entendimento molecular do câncer permitiram o desenvolvimento de novas terapias alvo e ferramentas auxiliares de diagnóstico. Além dos biomarcadores morfológicos e histopatológicos, uma crescente variedade de biomarcadores moleculares oferece ao paciente um diagnóstico e prognóstico mais detalhado (KUMAR, SHARMA & TIWARI, 2012; UTIKAL *et al.*, 2007).

A imunoexpressão da oncoproteína fator de crescimento epidermal humano 2 (*Human Epidermal Growth Factor receptor 2* - HER-2) é utilizada atualmente como diagnóstico auxiliar e para o direcionamento de terapia-alvo em câncer de mama (SIVRIDIS *et al.*, 2010). O aumento na expressão deste oncogene garante um fenótipo mais agressivo ao tumor podendo este, ser associado a fatores prognósticos tais como alto grau de variação histológica, tamanho tumoral, comprometimento linfonodal, alta proliferação celular e ausência da expressão de receptores hormonais (AHM & VOGEL, 2012; DUFFY *et al.*, 2011).

Um dos principais fatores limitantes no teste de imunohistoquímica (IHq) para HER-2 é a subjetividade dos resultados, logo métodos quantitativos podem ajudar na interpretação e conclusão diagnóstica pelos patologistas (VANCE, *et al.*, 2009).

Assim como os métodos imunohistoquímicos, ensaios quimioluminescentes têm sido empregados como instrumento de análise em diversas áreas, tendo grande auxílio na distinção de tumores semelhantes e de difícil interpretação através dos métodos histológicos rotineiros (DODEIGNE *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2009).

A emissão de radiação eletromagnética entre a faixa do visível ou infravermelho próximo gerado por uma reação química é conhecida como quimiluminescência (QL) e apresenta alta sensibilidade e seletividade (CAMPOS *et al.*, 2006). Os métodos de QL possuem benefícios que incluem a detecção ultra-sensível que varia de femtomoles a atomoles, testes rápidos e diversas aplicações analíticas (BRUSTEIN *et al.*, 2011).

O luminol e o isoluminol foram os primeiros compostos quimioluminescentes a serem utilizados como marcadores, no entanto, posteriormente foi detectada uma alta sensibilidade do éster de acridina (EA), apresentando alto desempenho em ensaios quimioluminométricos (YANG *et al.*, 2002). Desta maneira, o EA conjugado a

biomoléculas vem sendo empregado em diversos tipos de ensaios quimioluminométricos (CAMPOS *et al.*, 2006; BRUSTEIN *et al.*, 2011; NATRAJAN *et al.*, 2010).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo empregar anticorpo anti-HER-2 conjugado a um éster de acridina comercial com a finalidade de obter uma nova ferramenta quimioluminescente para o diagnóstico/prognóstico do carcinoma ductal invasivo de mama humana (CDI).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Câncer: Uma visão geral

Carcinogênese é definida como proliferações clonais, onde eventos genéticos e epigenéticos promovem alterações na fisiologia celular, determinando a transição de um estado normal da célula para um estado maligno (GREENMAN *et al.*, 2007; COMPAGNI & CHRISTOFORI, 2000; DEY, 2011).

Nas últimas décadas o câncer tomou uma proporção significativamente grande, sendo considerado um evidente problema de saúde pública no mundo (WHO, 2008). Segundo dados da Agência Nacional de Pesquisa no Câncer dos Estados Unidos (IARC), no ano de 2007 estimou-se que até o ano de 2030 poderá ocorrer o aparecimento de 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com a doença (WHO, 2008). As estimativas para o Brasil no ano de 2012 e 2013 apontam o aparecimento de 518.510 novos casos de câncer (INCA, 2012).

De acordo com Breivik (2005), a incidência do câncer aumenta com a idade, onde se observou que em países com alta expectativa de vida, aproximadamente 40% da população desenvolveu algum tipo de câncer sendo hábitos de vida, o meio ambiente e a herança genética os principais fatores de risco para o início da carcinogênese.

Os tumores benignos, em geral assemelham-se aos seus tecidos de origem e as células podem apresentar ou não suas relações normais. Estes tipos tumorais, comumente são envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso que os separam do tecido normal, apresentam crescimento lento e expansivo que permite a formação de vasos sanguíneos em torno do tumor para nutri-lo, adquirindo um padrão morfológico do tipo nodular (BRASILEIRO-FILHO *et al.*, 2000).

A evolução da doença neoplásica é dependente de eventos críticos que incluem a perda do controle proliferativo, evasão de apoptose, início da neoangiogênese, remodelamento tecidual, invasão de células neoplásicas em tecidos circundantes e disseminação de células tumorais para órgãos distantes (metástase) (BASKAR *et al.*, 2012; SPENCER *et al.*, 2004). A progressão de populações celulares malignas proporciona o desarranjo das características fenotípicas do tecido, culminando com o surgimento de um câncer invasivo (Figura 1) (VELASCO *et al.*, 2008).



**Figura 1:** Estágios do crescimento anormal de populações celulares mamárias normais até o câncer invasivo (VELASCO *et al.*, 2008).

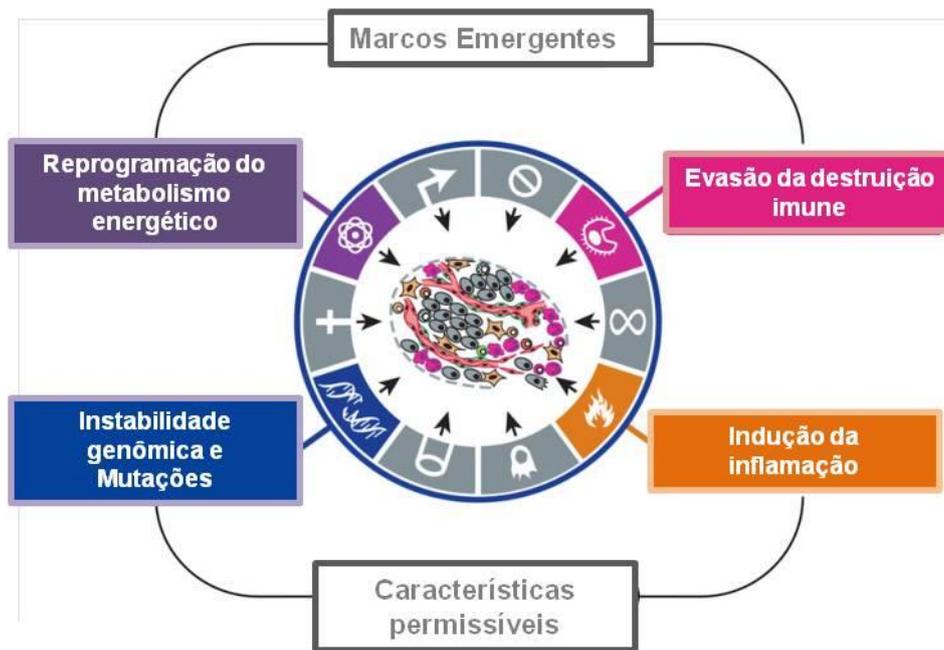
Esforços extensivos vêm sendo feitos, não só para definir os mecanismos moleculares subjacentes a progressão para malignidade, mas também para prever o desenvolvimento da doença e identificar novos modelos moleculares para a terapia (COMPAGNI & CHISTOFORI, 2000; SCHINZEL & HAHN, 2008).

Com base nisso, Hanahan e Weinberg (2000) observaram a existência de fatores cruciais ao desenvolvimento neoplásico que compreendem seis diferentes etapas biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de tumores humanos e constituem um princípio de organização do complexo evolutivo da doença neoplásica. As seis etapas do desenvolvimento do câncer incluem a manutenção do sinal de proliferação, a fuga do crescimento de genes supressores, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução de angiogênese, permitindo a invasão e metástase (Figura 2), (BASKAR *et al.*, 2012; HANAHAN & WEINBERG, 2000).



**Figura 2:** Marcos do câncer. Além dos seis marcos propostos, Hanahan e Weinberg (2000) adicionam a inflamação como um fator a mais no desenvolvimento da doença neoplásica.

Além dessas características, Hanahan e Weinberg (2000), adiciona mais um marco aos seis já propostos, onde o microambiente inflamatório é outro fator que contribui para o desenvolvimento do câncer. Mais tarde, eles relataram que além da inflamação, a instabilidade genômica, a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição imune, também representam eventos que sinalizam a transformação neoplásica (Figura 3) (HANAHAN & WEINBERG, 2011).



**Figura 3:** Adição de mais três elementos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Kopf e Zharhary (2007), afirmam que mudanças na expressão de proteínas celulares, também podem ocorrer durante o processo neoplásico promovendo alterações nas vias de sinalização, induzindo uma desordem no microambiente tumoral.

Além dos tumores apresentarem células cancerosas, eles possuem uma grande quantidade de células normais que contribuem para a aquisição de traços marcantes, criando um microambiente tumoral favorável ao desenvolvimento e estabilidade neoplásica (HANAHAN E WEINBERG, 2011).

A malignidade do câncer é dependente da quebra da ordem deste microambiente tecidual, da invasão do tecido por estímulos proliferativos e da sua capacidade de metástase para órgãos distantes (INGBER, 2008). Cada um desses eventos é impulsionado pela aquisição de alterações genéticas e / ou epigenéticas nas células do

tumor e pela co-opção de células estromais não neoplásicas, que juntos dotam as células metastáticas com características necessárias para gerar metástases macroscópicas (VALASTYAN E WEINBERG, 2011).

Entre as várias propostas conhecidas, o início da tumorigênese e a progressão do câncer dependem de um estímulo proliferativo, seja este dependente de hormônios, de danos ao genoma ou de fatores de crescimento (HARRIS *et al.*, 2004). Com base nisso, grandes descobertas durante a investigação do câncer nos últimos anos têm abordado a complexidade dos fatores que envolvem a evolução do tumor, especialmente os mecanismos moleculares, que representam a base destas transformações proliferativas normais em derivados altamente malignos (HERZIG & CHRISTOFORI, 2002; BASKAR *et al.*, 2012).

Processos endógenos tais como erros na replicação do DNA, a instabilidade química intrínseca de certas bases do DNA ou de ataques de radicais livres gerados durante o metabolismo, podem resultar em danos no genoma, caracterizando uma série de mutações que promovem alterações nas funções de genes cruciais. Os danos ao material genético também podem resultar de interações exógenas como produtos químicos cancerígenos, radiação ultravioleta e radiações ionizantes (STRATON *et al.*, 2009; BERTRAM, 2001).

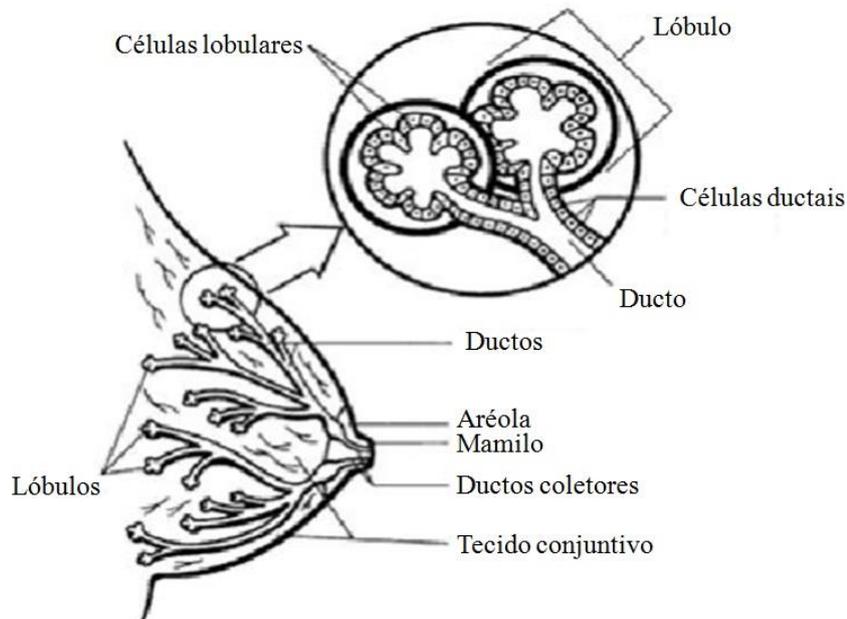
Esses processos moleculares endógenos podem ser caracterizados pela amplificação de oncogenes, cujo estímulo acarreta um aumento desordenado de células alteradas, além de promover a disseminação e sobrevivência destas populações celulares malignas no microambiente tumoral resultando em um câncer mais agressivo (YARDEN & SLIWKOSKI, 2001; AHMED *et al.*, 2011). Em casos de cânceres mamários, a amplificação do oncogene HER-2 é atualmente bastante abordada, pelo fato de estas pacientes apresentarem um prognóstico ruim, a sobrevida reduzida, além de desenvolver um comprometimento linfonodal e ser passíveis de terapia-alvo molecular (AHMED *et al.*, 2011).

## **2.2 Câncer de Mama e o Oncogene HER-2**

As glândulas mamárias estão localizadas no tecido subcutâneo, onde são formadas por tecido parenquimatoso que é dividido em um número de 15 a 20 lóbulos e

por um estroma composto por tecido adiposo, conjuntivo, vasos e nervos (MACÉA & FREGNANI, 2006). Cada lóbulo é composto por ductos intralobulares, uma série de dutos que levam secreções aos ductos lactíferos sendo secretadas nos mamilos (Figura 4). Estes ductos lactíferos possuem um epitélio colunar com um núcleo arredondado e o citoplasma contém poucas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (VALESCO *et al.*, 2008).

O tecido conjuntivo intralobular é hormônio responsável, formado por colágeno, em uma matriz de ácido mucopolissacarídeo, com fibroblastos e pobres em linfócitos e macrófagos. Os ductos intralobulares e lobulares (ácinos) são formados por células cubóides, enquanto os ductos extralobulares são revestidos por células epiteliais colunares (PELEKANOU & LECLERCQ, 2011; MACÉA & FREGNANI, 2006).



**Figura 4:** Anatomia da mama contendo seus ductos e lóbulos (VALESCO *et al.*, 2008).

O câncer da mama é o tipo de neoplasia mais comum entre as mulheres e representa a segunda causa de morte no mundo, apresentando-se como uma das doenças com a maior heterogeneidade genotípica, fenotípica e clínica (RAKHA *et al.*, 2008).

As estimativas apontam que na população mundial a sobrevida média das pacientes após 5 anos é de 61% (INCA, 2010). No Brasil, foi estimado o aparecimento de

52.680 novos casos de câncer de mama somente no ano de 2012, e 12.098 mortes por neoplasias malignas da mama (INCA, 2012) estando nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste a incidência deste tipo de câncer em primeiro lugar, na proporção de 26,2%, 28,4% e 29%, respectivamente (INCA, 2012).

Dentre os tumores malignos da mama, o carcinoma ductal invasivo (CDI) representa o maior grupo, constituindo cerca de 65 a 80% dos carcinomas mamários (YODER *et al.*, 2007). O CDI é iniciado num sistema de minúsculos tubos que levam a secreção dos lóbulos para o mamilo. Este processo começa quando células epiteliais alteradas que revestem os ductos se dividem e se multiplicam e invadem as células ductais e, em estágios mais avançados da doença, podem invadir o estroma (VELASCO *et al.*, 2008).

O CDI é basicamente caracterizado por uma formação tubular que invade o parênquima adjacente, sendo vinte por cento dos CDI categorizados em um subtipo específico, como tubular, medular, mucinoso, papilar e micropapilar, apresentando características citológicas e histológicas únicas, porém, 80% dos CDIs não possuem ainda subclassificação (YODER *et al.*, 2007).

Este tipo tumoral se desenvolve durante longos períodos de tempo podendo resultar em formas metastáticas, por isso métodos mais sensíveis de diagnóstico como a mamografia digital e a ressonância magnética de imagem as quais tem proporcionado um aumento significativo no diagnóstico de carcinomas ductais *in situ* e invasivos, vêm sendo bastante utilizados (LEONARD E SWAIN, 2004).

Um risco aumentado de recorrência de CDI foi associado ao grau de atividade nuclear moderado ou alto podendo levar a metástase (KERLIKOWSKA *et al.*, 2003; KENNECKE *et al.*, 2010). Com base nisso, o grau nuclear foi utilizado como um parâmetro importante na decisão do diagnóstico e posterior tratamento (CHAPMAN *et al.*, 2007).

Atualmente, há uma série de fatores prognósticos para o câncer de mama invasivo que funcionam como indicadores contribuindo na determinação da história natural da doença, bem como auxiliando na decisão do tipo de intervenção necessária para um melhor tratamento. Além disso, os fatores preditivos avaliam as pacientes que receberam determinado tipo de tratamento sistêmico, estando associados à resistência e à sensibilidade terapêutica (HARRIS *et al.*, 2004; SCHMIDT *et al.*, 2010). O estudo do perfil de expressão gênica tem gerado grande interesse, onde vem sendo observado

uma melhoria na informação do prognóstico prevendo uma resposta satisfatória à quimioterapia adjuvante (HAAS *et al.*, 2011).

Diferentes alterações genéticas herdadas ou adquiridas foram identificadas no câncer de mama humano e, em uma fração do câncer mamário, como parte de seu desenvolvimento, sofre amplificação de genes (BELENGEANU *et al.*, 2010). Diante disso, alguns biomarcadores prognósticos moleculares e diagnósticos, com base na expressão gênica de tumores, foram propostos (BELENGEANU *et al.*, 2010).

O HER-2, também conhecido como neu ou c-erbB-2, é um proto-oncogene que foi inicialmente identificado como um gene transformado ativo em neuroblastoma de rato induzidos quimicamente. É um membro da família do receptor humano do fator de crescimento epidérmico e está localizado no cromossomo 17q21 (DAVOLI, HOCEVAR & BROWN, 2010). O produto do gene de 185-kDa é um receptor transmembrana do fator de crescimento com atividade de tirosina quinase, e é conhecido por estar envolvido na transdução de sinal do crescimento celular, diferenciação celular, adesão e motilidade (BELENGEANU *et al.*, 2010).

A amplificação do HER-2 resulta em um aumento no número de receptores na superfície das células tumorais, onde cerca de 20.000 moléculas por célula são observadas em situação normal, para um número de 2.000.000 de moléculas de HER-2 por célula tumoral (AHMED *et al.*, 2011). Esse aumento altera o comportamento das células biológicas, promovendo a sua proliferação e sobrevivência, resultando em um câncer de mama com fenótipo mais agressivo e uma sobrevida livre de doença reduzida independentemente do envolvimento nodal e outros parâmetros prognósticos clínicos (AHN & VOGEL, 2012; AHMED *et al.*, 2011).

A superexpressão ou amplificação deste oncogene é considerada um biomarcador prognóstico tanto para pacientes negativos como para pacientes com nodos positivos (GOWN, 2008; DAHABREH *et al.*, 2008). O teste para HER2 é recomendado pelo Colégio Americano de Patologistas (CAP) em casos de câncer de mama não apenas por ter valor diagnóstico e prognóstico, mas por ser passível de terapia alvo-molecular (WOLFF *et al.*, 2007).

Até o presente momento o câncer de mama é diagnosticado clínica e histologicamente, embora algumas mutações foram observadas em pelo menos quatro a seis genes reguladores, localizadas em diferentes cromossomos no núcleo da célula

tumoral podendo ser detectados através do teste de imunohistoquímica (IHq) (KENEMANS *et al.*, 2004).

Com a finalidade de localizar alterações específicas de determinados tipos tumorais, para o entendimento da progressão da doença neoplásica, diversos trabalhos tem utilizado a técnica IHq (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2006).

Como forma de diagnóstico auxiliar, a Sociedade Americana de Oncologistas Clínicos (ASCO) e o CAP, recentemente, lançaram novas diretrizes para o teste imunohistoquímico do HER-2 no câncer de mama, sendo este descrito como negativo (0/1+), equívoco (2+) ou positivo (3+) (GOWN, 2008). Nos casos ditos equívocos (2+), é necessária a utilização do teste de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para a confirmação do diagnóstico (AHMED *et al.*, 2011).

Diante da subjetividade dos resultados e de análises semi-quantitativas obtidas pela IHq, novas alternativas diagnósticas para o câncer de mama vêm sendo utilizadas, dentre as quais, os ensaios quimioluminescentes estão sendo bastantes abordados, pelo limite de detecção ser ultra-sensível, serem testes rápidos e possuem um amplo campo de aplicações analíticas (BRUSTEIN *et al.*, 2011; SALES *et al.*, 2004; FERREIRA & ROSSI, 2002).

### 2.3 Quimioluminescência

Quimioluminescência (QL) é o fenômeno observado quando o produto excitado de uma reação química volta ao seu estado fundamental, ocorrendo uma emissão de fótons (DODEIGNE *et al.*, 2000). Devido à sua alta sensibilidade, ampla faixa de calibração e adequação para a miniaturização, a QL tem sido utilizada em uma ampla gama de aplicações (FAN *et al.*, 2009).

A aplicação da QL como ferramenta analítica depende da junção da substância de interesse a um dos elementos participantes da reação quimioluminescente ou ao produto no seu estado excitado. A concentração da amostra é proporcional à emissão de luz ou a um parâmetro físico associado à luminescência, tal como cor ou polarização da luz emitida (CAMPOS *et al.*, 2006; BRUSTEIN *et al.*, 2011; CAMPBELL *et al.*, 1985).

As reações de QL podem ocorrer em estado sólido, líquido ou em gases. Em uma simples demonstração, pode-se observar que [I] é o produto intermediário de alta energia

da junção de dois reagentes (A e B), onde este produto, de curta duração, retorna ao seu estado normal, emitindo energia em forma de luz (CARLSON, LEWIS & LIM, 2000; ARAÚJO-FILHO, MELO-JÚNIOR & CARVALHO JR, 2011).



O luminol e Isoluminol foram os primeiros compostos quimioluminescentes a serem utilizados em ensaios quimioluminométricos, mas foram rapidamente substituídos pelo EA (KRICKA, 2003).

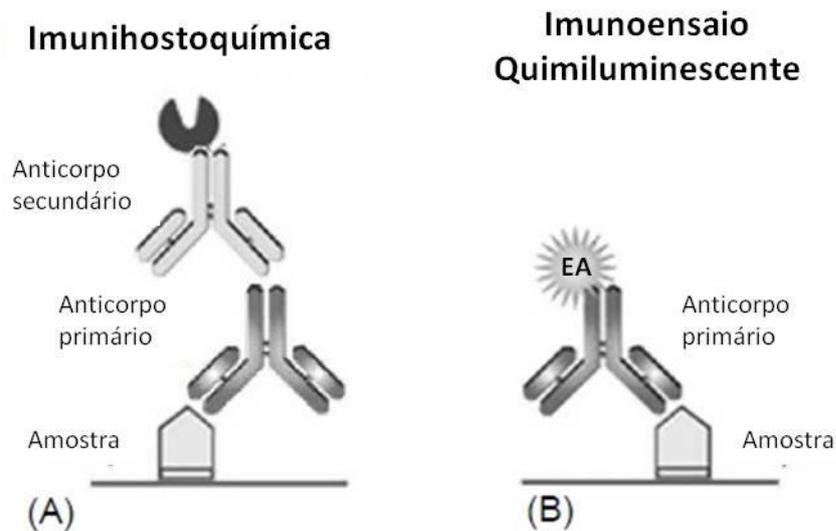
O EA foi introduzido nos imunoenaios pela necessidade da substituição dos marcadores radioisótopos que possuem uma curta meia-vida, são substâncias que representam perigo à saúde e por causarem problemas com os dejetos gerados por estes marcadores (WEEKS *et al.*, 1986). Por conta disso, o EA vem sendo aplicado em diversas pesquisas nas mais diversas áreas biotecnológicas (NATRAJAN *et al.*, 2010).

A acridina é um composto fluorescente onde seus sais, quando excitados, produzem luz na presença de peróxido de hidrogênio em meio alcalino. Dentre os sais derivados da acridina, o EA é tido como um marcador mais sensível, que recebeu um destaque especial por oxidar facilmente o peróxido de hidrogênio e formar um produto excitado que libera energia em forma de luz (YANG *et al.*, 2002).

O processo de medição da luz emitida pelo EA nestas condições pode ser concluído mais rapidamente, sendo mais vantajoso nas análises automatizadas de imunoenaios (NATRAJAN *et al.*, 2010). O limite de detecção deste marcador está tipicamente na faixa de atomoles, sendo por isso considerado um bom marcador quimioluminescente (KRICKA, 2003).

A imunoquimioluminescência é uma técnica utilizada para uma melhor abordagem da doença sendo um teste rápido e de detecção ultra-sensível, tendo se tornado bastante estudada nos últimos anos utilizando o EA como composto quimioluminescente (FAN *et al.*, 2009). Assim, os imunoenaios baseados em quimioluminescência possuem maior sensibilidade do que aqueles com base em técnicas de gerações anteriores, como a IHq (ARAÚJO-FILHO, MELO-JÚNIOR & CARVALHO JR, 2011).

Em comparação, a IHq é uma técnica baseada na aplicação de anticorpos altamente específicos, aptos a se ligarem a um antígeno tumoral, onde são detectados através de anticorpos secundários específicos conjugados à enzimas, e os imunoenaios quimioluminescentes além de reconhecerem os antígenos tumorais com sensibilidade e especificidade possibilitam a quantificação do sinal fornecido pela IHq (Figura 5) (TERRIER *et al*, 2004; ARAÚJO-FILHO, MELO-JÚNIOR & CARVALHO JR, 2011).



**Figura 5:** Comparação entre os ensaios imunohistoquímicos e quimioluminescentes. Em (A), um anticorpo primário se liga a amostra e posteriormente um anticorpo secundário marcado com uma enzima liga-se ao anticorpo primário de modo que a reação seja observada através da revelação da referida enzima. Em (B), o anticorpo primário é apenas conjugado ao EA e incubado com a amostra para quantificação dos fotos emitidos pela substância quimioluminescente (ARAÚJO-FILHO, MELO-JÚNIOR & CARVALHO JR, 2011).

Tendo em vista que as formas de diagnóstico clínico e de diagnóstico auxiliar do câncer de mama são consideradas ferramentas de análise qualitativas e semi-quantitativas, podemos considerar que novos métodos de quantificação possibilitariam uma melhor abordagem do diagnóstico desta neoplasia.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, E.R.; VOGEL, C.L. Dual HER2-targeted approaches in HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* v. 131, p. 371–383, 2012.
- AHMED, S.S., *et al.* HER2/neu revisited: quality and interpretive issues. *Journal of Clinical Pathology.* v. 64, p. 120-124, 2011.
- ARAÚJO-FILHO, J.L.S. *et al.* Galectina-3 em tumores de próstata: imunohistoquímica e análise digital de imagens. *J Bras Patol Med Lab.* v. 42, n. 6, p. 469-475, 2006.
- ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; MELO-JUNIOR, M.R.; CARVALHO JR, L.B. Potential Applications of the Chemiluminescent Methods in Tumoral Diseases Investigation. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* v. 2, p. 392-400, 2011.
- BASKAR, R.; LEE, K.A.; YEO, R.; YEOH, K.W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* v. 9, p. 193-199, 2012.
- BELENGEANU, A. *et al.* Amplification of HER-2 gene in breast cancer: immunohistochemical and FISH assessment. *Romanian Journal of Morphology and Embryology.* v. 51, p. 321–326, 2010.
- BERTRAM, S.J. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine.* v. 21, p. 167-223, 2001.
- BRASILEIRO FILHO, G. Patologia. In: Bogliolo, L. Patologia. Sexta edição. Editora Guanabara Koogan S.A. p. 514-523, 2000.
- BREIVIK, J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Seminars in Cancer Biology.* v. 15, p. 51-60, 2005.
- BRUSTEIN, V.P.; Cavalcanti, C.L.B.; Melo-Junior, M.R.; Correia, M.T.S.; Beltrão, E.I.C.; Carvalho, L.B. Chemiluminescent Detection of Carbohydrates in the Tumoral Breast Diseases. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* v. 165, p. 268-275, 2011.

CAMPBELL, A.K.; HALLET, M.B.; WEEKS, I. Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. *Methods in Biochemical Analysis*. v. 31, p. 317-416, 1985.

CAMPOS, L.M. *et al.* Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*. v. 11, p. 480-484, 2006.

CARLSON, R.; LEWIS, S.W.; LIM, K.F. Seeing the light: Using chemiluminescence to demonstrate chemical fundamentals. *Aust. J. Chem. Ed.*, 2010

CHAPMAN, J.A. *et al.* Ductal carcinoma in situ of the breast cancer (DCIS) with heterogeneity of nuclear grade: prognostic effects of quantitative nuclear assessment. *BMC Cancer*. v. 7, p. 174-181, 2007.

COMPAGNI, A. & CHRISTOFORI, G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *British Journal of Cancer*. v. 83, n. 1, p. 1–5, 2000.

DAHABREH, I.J. *et al.* Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist*. v. 13, p. 620–630, 2008.

DAVOLI, A.; HOCEVAR, B.A.; BROWN, T.L. Progression and treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. v. 65, p. 611–623, 2010.

DEY, P. Epigenetic changes in tumor microenvironment. *Indian J Cancer*. v. 48, p. 507-512, 2011.

DODEIGNE, C. *et al.* Chemiluminescence as diagnostic tool: a review. *Talanta*. v. 51, p. 415–439, 2000.

DUFFY, M.J.; O'DONOVAN, N.; CROWN, J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *Cancer Treatment Reviews*. v. 37, p. 151–159, 2011.

FAN, A. *et al.* Chemiluminescence Platforms in Immunoassay and DNA Analyses. *Analytical Sciences*. v. 25, p. 587-597, 2009.

FERREIRA, E.C.; ROSSI, A.V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Química Nova*. v. 25, p. 1003-1011, 2002.

- GOWN, A.M. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Modern Pathology*. v. 21, p. 8-15, 2008.
- GREENMAN, C. *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. v. 446, p. 153,158, 2007.
- HAAS, S.J. *et al.* Genomic Testing and Therapies for Breast Cancer in Clinical Practice. *Journal of Oncology Practice*. v.7, p. 1-7, 2011.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. v. 100, p. 57-70, 2000.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. v. 144, p. 646-674, 2011.
- HARRIS, J.R. *et al.* Diseases of the breast. 3.th. Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
- HERZIG, M. & CHRISTOFORI, G. Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1602, p. 97– 113, 2002.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer; Ministério da Saúde; Coordenação de prevenção e Vigilância. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2009-2012, Rio de Janeiro (Brasil) Disponível em <http://www.inca.gov.br>, acessado em Janeiro de 2012.
- INGBER, D. E. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment? *Seminars in Cancer Biology*. v. 8, p. 356-364, 2008.
- KENEMANS, P. *et al.* Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*. v. 49, p. 34–43, 2004.
- KENNECKE, H. *et al.* Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. v. 28, p. 3271-3277, 2010.
- KERLIKOWSKE, K. *et al.* Characteristics associated with recurrence among women with ductal carcinoma in situ treated by lumpectomy. *J Natl Cancer Inst*. v. 95, p.1692-1702, 2003.
- KOPF, E.; ZHARHARY, D. Antibody arrays – an emerging tool in cancer proteomics. *Biochem Cell Biol*. v. 39(7-8), p. 1305-1317, 2007.

- KRICKA, L.J. Clinical applications of chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*. v. 500, p. 279-386, 2003.
- KUMAR, R.; SHARMA, A.; TIWARI, R.K. Application of microarray in breast cancer: An overview. *J Pharm Bioallied Sci*. v. 4, p.21-26, 2012.
- LEONARD, G. D.; SWAIN, S. M. J. Ductal carcinoma in situ, complexities and challenges. *Nat Cancer Inst*. v. 96, p. 906-920, 2004.
- MACÉA, R.J.; FREGNANI, J.H.T.G. Anatomy of the Thoracic Wall, Axilla and Breast. *Int. J. Morphol*. v. 24, p. 691-704, 2006.
- NATRAJAN, A. *et al.* Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output. *Analytical Biochemistry*. v. 406, p. 204–213, 2010.
- PELEKANOU, V.; LECLERCQ, G. Recent insights into the effect of natural and environmental estrogens on mammary development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol*. v. 55, p. 869-878, 2011.
- RAKHA E.A. *et al.* Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology*, v. 52, p. 67–81, 2008.
- SALES, A.O.; RODRIGUES, S.J.P.; BACCHI, C.E. Estudo comparativo entre os métodos LSAB®+ e Herceptest® para a detecção de HER-2/neu em carcinoma de mama. *J Bras Patol Med Lab*. v. 40, p. 265-71, 2004.
- SCHINZEL, A.C.; HAHN, W.C. Oncogenic transformation and experimental models of human cancer. *Frontiers in Bioscience*. v.13, p. 71-84, 2008.
- SCHMIDT, M. *et al.* New prognostic and predictive factors in breast cancer. *Minerva Ginecol*. v. 62, p. 599-611, 2010.
- SPENCER, S.L.; BERRYMANB, M.J.; GARCÍA, J.A.; ABBOTT, D. An ordinary differential equation model for the multistep transformation to cancer. *Journal of Theoretical Biology*. v. 231, p. 515–524, 2004.

STRATTON, M.R., CAMPBELL, P.J., FUTREAL, P.A. The cancer genome. *Nature*. v. 458, p. 719-724, 2009.

TERRIER, N. *et al.* Determination of beta2-microglobulin in biological samples using an immunoenzymometric assay (chemiluminescence detection) or an immunoturbidimetric assay: comparison with a radioimmunoassay. *Clinical laboratory*. v. 50, p. 675-683, 2004.

UTIKAL, J.; SCHADENDORF, D.; UGUREL, S. Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res*. v. 298, p. 469–477, 2007.

VALASTIAN, S.; WEINBERG, R.A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cel*. v. 147, p. 275-292, 2011.

VELASCO, I.B.G.; COUTIÑO, R.; MARTÍNEZ, G.; CRUZ, P.H. Marcadores Glicosilados en Cáncer de Mama. *REB*. v. 27, n. 2, p. 52-59, 2008.

VANCE, G.H. *et al.* Genetic Heterogeneity in HER2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. v. 133, p. 611-612, 2009.

WEEKS, I.; STURGESS, M.; BROWN, R.C.; WOODHEAD, J.S. Immunoassays using acridinium esters. *Methods Enzymol*. v. 133, p. 366-387, 1986.

WOLFF, A.C. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. v. 15, p. 18-145, 2007.

YARDEN, Y.; SLIWKOSKI, M.X. Untangling the ERbB2 signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. v. 2, p. 127-137, 2001.

YANG, M. *et al.* Electrochemiluminescence assay for the detection of acridinium esters. *Analit Chim Acta*. v. 461, p.141-146, 2002.

YODER, B.J.; WILKINSON, E.J.; MASSOLL, N.A. Molecular and Morphologic Distinctions between Infiltrating Ductal and Lobular Carcinoma of the Breast. *The Breast J*, v. 13, p. 172–179, 2007.

ZHAO, L.; SUN, L.; CHU, X. Chemiluminescence immunoassay. Trends in Analytical Chemistry, v. 28, p. 404-415, 2009.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Obtenção do conjugado anti-HER-2-EA e seu emprego no diagnóstico quimiluminescente do carcinoma ductal invasivo de mama humana (CDI).

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Conjugar ao anticorpo (anti-HER2) o éster de acridina (EA);
- Purificar o conjugado anticorpo-EA usando o Sephadex G-25;
- Realizar imunohistoquimiluminescência das amostras de CDI com o conjugado anti-HER-2-EA;
- Correlacionar os resultados da imunohistoquimiluminescência com o perfil de expressão de HER-2 (1+, 2+ ou 3+) nas amostras de CDI.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 Caracterização do Estudo**

Foi realizado um estudo retrospectivo de pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo (CDI) com base nas características patológicas imunohistoquímicas do tumor. Este projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Bioética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE Nº 195/09).

### **5.2 População e Amostras Clínicas**

Cinquenta biópsias mamárias de pacientes registradas e diagnosticadas com CDI, e três amostras de tecido mamário normal foram selecionadas, no período de 2006 a 2010, no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### **5.3 Imunohistoquímica**

Secções de tecidos embebidos em parafina (4 µm) foram cortados e submetidos à desparafinização com Xilol (Xilol I a IV), seguida de hidratação com álcool etílico (100%, 100%, 100%, 70%). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito usando o peróxido de hidrogênio em metanol (1:1). A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato 10mM pH 6,0 aquecido em câmara de vapor d'água. As amostras de tecidos foram incubados com o anticorpo primário anti-HER-2 (Imuny - Rheabiotech®) (1:400) por 2 horas a 4°C, seguido de incubação com anticorpo secundário por 30min a 37°C. A reação imunohistoquímica foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e os tecidos foram contra-corados com hematoxilina. A marcação foi avaliada em microscopia óptica.

### **5.4 Conjugação Anti-HER-2 – EA**

Anti-HER-2 (Imuny - Rheabiotech®) foi conjugado com EA (Universidade de Keio - Japão) de acordo com Campos e colaboradores (2006). O anticorpo (1 mL contendo de

1,1mg proteína) foi incubado por 1h a 25°C com 7µL de solução de EA (0,2 mg diluído em 400µL de N, N-dimetilformamida). O conjugado (anti-HER-2 -EA) foi adicionado a uma coluna de Sephadex G-25 (10x1), previamente equilibrada com tampão fosfato 10mM, pH 7,2 (100mL). Alíquotas de 1mL foram coletadas e o conteúdo protéico foi determinado espectrofotometricamente em 280nm. Todas as alíquotas tiveram a quimioluminescência determinada. As alíquotas, as quais foram observadas o pico de proteína após a determinação de absorção e pico de unidade relativa de luz (URL) foram juntas em um pool e mantidos a 4°C até o uso.

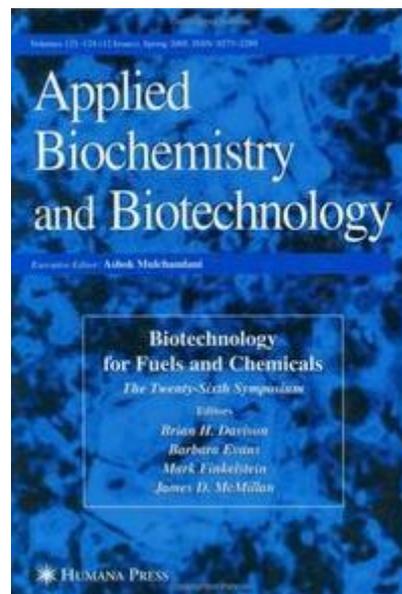
### **5.5 Preparação Histológica e Reação Quimioluminescente**

A metodologia utilizada foi preconizada por Campos e colaboradores (2006). Secções de tecido emblocados em parafina foram cortados (8 µm) e desparafinizados com Xilol (Xilol I a IV), seguida de hidratação com álcool etílico (100%, 100%, 100%, 70%). Foi adicionado 100µL de conjugado anti-HER-2-AE aos cortes de CDI e incubados por 2h a 4°C. Foram realizados cortes de áreas de 1cm<sup>2</sup> nestes tecidos marcados com o conjugado, transferidos para um eppendorf® contendo 50 µL de tampão fosfato 10mM, pH 7.2 e submetidos a reação de quimiluminescência em luminômetro (Modulus Single Tube 9200 001 - Turner BioSystems, USA) a partir da adição 50µL de reagente A. (peróxido de hidrogênio) e 50 µL de reagente B (hidróxido de sódio). A reação quimiluminescente foi registrada como URL a partir da emissão de fotos.

### **5.6 Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados através do software GraphPad Prism 5, onde foi utilizado o teste de Mann Whitney para obtenção do valor de significância (p) entre as amostras diagnosticadas 1+, 2+ e 3+. Para análise do gráfico RLU X Área foi aplicado a regressão linear nos casos 1+ e 2+, e nos casos diagnosticados como 3+ foi aplicado a equação exponencial.

## 6 ARTIGO CIENTÍFICO



A ser submetido ao periódico Applied Biochemistry and Biotechnology.

## **HER-2 STATUS IN BREAST CANCER USING IMMUNOHISTOCHEMILUMINESCENCE DETECTION**

Marina Ferraz Cordeiro<sup>1</sup>, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo<sup>1</sup>, Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti<sup>1</sup>, Luiz Bezerra de Carvalho Junior <sup>1,2</sup>, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão<sup>1,2</sup>.

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil;
2. Departamento de Bioquímica - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil.

Correspondence to Eduardo Beltrão, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Av. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitário, 50670-910, PE, Brazil.

Tel: 55-81-2101-2504. Fax: 55-81-2126-8485. E-mail: ebeltrao@hotmail.com

## Abstract

Chemiluminescence has been highlighted where satisfactory results were observed in diagnostics research of some cancers. CL was applied to quantify the immunohistochemistry of HER-2 protein, expressed at high levels in human breast cancer cells, conjugated to Acridinium Ester. Thus this study aimed to obtain the conjugate anti-HER-2-EA and evaluate the recognition assessment of this immune complex in diagnosis of invasive ductal carcinoma of human breast. Fifty IDC samples obtained from the Clinical Hospital at Federal University of Pernambuco were submitted to IHC using streptavidin-biotin-peroxidase method and immunochemiluminescence with anti-HER-2-AE. Results were expressed in Relative Lights Units. IHC showed seven positive samples (3+), five indeterminate (2+) and thirty-eight negative (0 or 1+). CL analysis provided significant results, where 3+ cases presented highest RLU ( $246,982 \times 10^3 \pm 2.061 \times 10^3$ ) compared to 2+ ( $76,146 \times 10^3 \pm 0.290 \times 10^3$ ), negative ( $27,415 \times 10^3 \pm 1.445 \times 10^3$ ) and normal controls ( $27,064 \pm 2.060 \times 10^3 \times 10^3$ ). The conjugate anti-HER-2-AE was effective to evaluate human mammary tumors, presenting different HER-2 expression profile, allowing its quantitative evaluation and as consequence decreasing the subjectivity in diagnosis leading to differential approach in IDC.

Key-words: chemiluminescence, breast cancer diagnosis, HER-2.

## Introduction

Chemiluminescence is described as a production of electromagnetic radiation from a chemical reaction, where the CL intensity is dependent on the concentration of a reagent participating in the chemiluminescent reaction [1]. This technique has been widely used in several areas of analytical applications due to its ultra-sensitive detection ranging from attomole to zeptomole and be short-term assays [2].

Acridinium ester (AE) CL has been studied for four decades [3]. In development of high performance chemiluminometric assays using labeled molecules, AE has been considered effective marker in signaling biomacromolecules [4]. AE is used in chemiluminescent immunoassays replacing the assays which use horseradish peroxidase as label or other luminescent molecules [5].

Molecular biomarkers, as well as HER-2, play key roles in the diagnostic classification and prognosis of various cancers, having great importance in monitoring the clinical course of disease and response to therapy [6]. HER-2 over expression in invasive ductal carcinoma (IDC) results in a more aggressive tumor growth and a poor prognosis due to the increase in the signaling of cell growth and differentiation [7]. This oncogene is amplified in 10% to 30% patients with IDC and considered a major prognostic factor being used as an auxiliary tool in the diagnosis of this disease [8].

Immunohistochemistry is one of the most common choice for the diagnosis of neoplasias but it has limitations, giving its semi-quantitative nature since the analysis is categorized in groups of null or weak, moderate and intense immunostaining, besides being dependent on the researcher's experience [9,10]. In this scenario chemiluminescence provides quantitative results eliminating the possibility of unreliable results [11].

The present study aimed to obtain the conjugate anti-HER-2-EA and evaluate the recognition assessment of this immune complex in the diagnosis of IDC of human breast using immunohistochemiluminescence assay.

## **Materials and Methods**

### **Human mammary specimens**

Fifty formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies diagnosed as invasive ductal carcinoma (IDC) and three normal tissues (from reducing mastoplasty) were obtained from Anatomy Pathological Service of Clinical Hospital at Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil. This study was approved by the Bioethical Board of the Health Science Centre of the Federal University of Pernambuco, Brazil (SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE No 195/09).

### **Immunohistochemistry**

Biopsies slices (4  $\mu\text{m}$ ) were deparaffinized with xylene followed hydration with graded ethanol. Tissues were incubated with hydrogen peroxide and methanol (1:1) for 30min followed by incubation with a 10mM citrate buffer pH 6.0 in steamer. Samples were incubated with primary antibody anti-HER-2 (Imuny - Rheabiotech®) (1:400) for 2 hours at 4°C, and after with secondary antibody for 30 minutes at 37°C. The reaction was revealed with diaminobenzidine and tissues were counter-stained with hematoxylin. Staining was visualized by optical microscopic analysis. Protocols were carried out in triplicate

### **Conjugation of Anti-HER-2 to AE**

Anti-HER-2 was conjugated to AE according to Campos *et al* [2]. Antibody anti-HER-2 (1mL containing 1.1mg of protein) was incubated for 1 hour at 25°C with 7µL of AE solution (0.2 mg diluted in 400 µL of N,N-dimethylformamide). The conjugate anti-HER-2-AE was chromatographed in a column of Sephadex G-25 (10x1), previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2 (100 mL). Aliquots of 1 mL were collected and their protein content was spectrophotometrically determined at 280nm. All aliquots had their CL assayed. Aliquots of protein peak with chemiluminescence were pooled and kept at 4°C until use.

### **Chemiluminescence using Anti-HER-2-AE**

IDC biopsies were cut (8 µm) and deparaffinized with xylene followed hydration with graded ethanol. Slices were incubated with 100 µL of conjugate Anti-HER-2-AE (48 µg/mL) for 2 hours at 4°C and then tissue areas of 1cm<sup>2</sup> were transferred to an eppendorf tube containing 50 µL of 10mM phosphate buffer pH 7.2. Chemiluminescence was developed in a Luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems - USA) adding 50 µL of reagent A (hydrogen peroxide) and 50 µL of reagent B (sodium hydroxide). Foton emissions were measured as relative light units. The relationship between RLU x tissue area was assayed using sections with 0.125; 0.25; 0.5 and 1cm<sup>2</sup>. Protocols were carried out in triplicate.

### **Statistical analysis**

Mann Whitney test (nonparametric test) was used in GraphPad Prism 5 software.

## Results and Discussion

In the last decades it has been observed an increasing incidence of breast cancer where statistics indicate mortality rates ever higher [12]. At present, immunohistochemistry is the method most used to determine HER-2 status since it is a relatively low cost test and accessible to a laboratorial routine [13].

The score system used for further determining the immunohistochemical reactions for HER-2 is HercepTest™ where the cases 0 and 1+ are negative, 2+ cases are weak positive and 3+ are positives [9]. Currently the College of American Pathologists (CAP) and the American Society of Clinical Oncology (ASCO) suggested that the 2+ cases were considered indeterminate, recommending the use of a more specific test as fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for diagnosis determination [14,15].

In our samples, we used the system HercepTest™ but we adopted the CAP/ASCO recommendation for 2+ samples to be considered indeterminate.

Our findings showed that 7 out of 50 samples were positive (3+) for HER-2 in IHC. Five cases were indeterminate (2+) and 38 were 1+ or negative. The 14% of HER-2 positivity for IDC observed in our study is consistent with HER-2 frequency studies in breast cancer [8].

The effectiveness of immunohistochemistry compared to FISH is reported as comparable for some studies but others report that there is a high degree of discordance between the results provided by both techniques [12, 16, 17]. Due to the subjectivity of result analysis, intrinsic to both techniques, including for HER-2 status evaluation, has lead for the search of new diagnostic methods less subjective.

The chemiluminescent assays have been widely used as a quantitative assay in recent years [18]. The method still has great advantages such as high sensitivity and stability of reagents, offer low-risk biological, tests are easy to use and feature detection accuracy [5, 19].

First studies of Weeks [20] reported the use of antibody conjugated to AE as the immunochemiluminescence detecting method of  $\alpha$ 1-fetoprotein. In our study we used the immunochemiluminescence method to quantify the HER-2 status in IDC and compare them to the IHC results. The conjugate anti-HER-2-AE purification profile using Sephadex G-25 is shown in Figure 1.

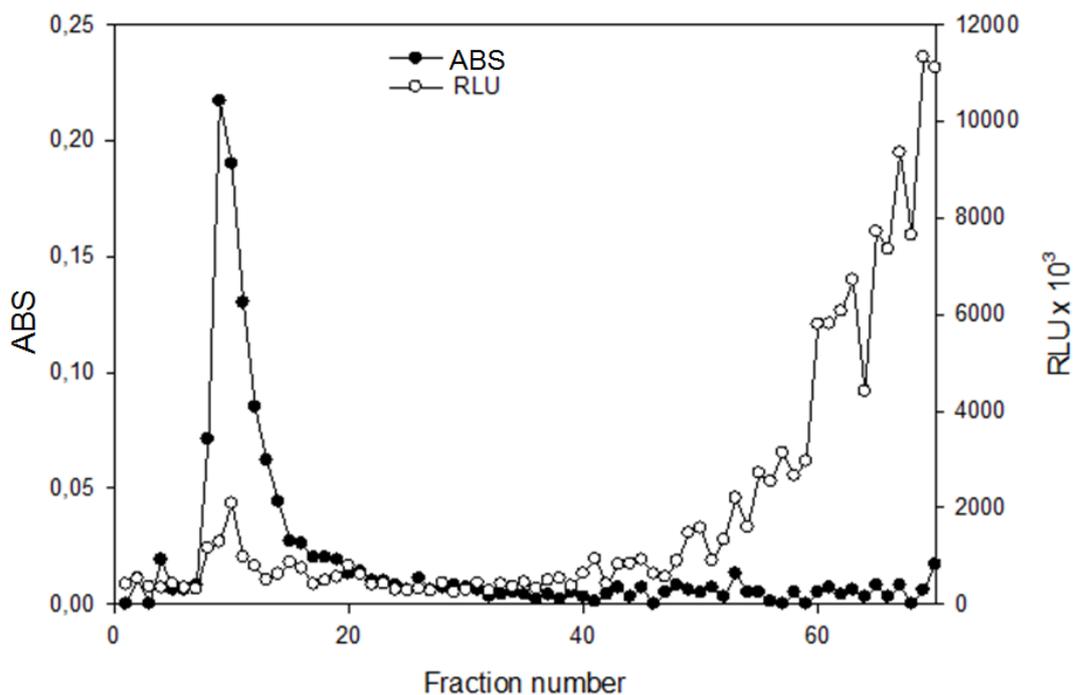


Figure 1: Anti-HER-2-AE elution profile from Sephadex G-25 column (10x1). Elution was carried out with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2. Fractions (aliquots of 1 mL) were collected and chemiluminescence and protein content assayed.

Our results showed that there is a significant difference ( $p = 0.0025$ ) in RLU emitted in 3+ cases ( $246,982 \times 10^3 \pm 2.061 \times 10^3$ ) in comparison to 2+ cases ( $76,146 \times 10^3 \pm 0.290 \times 10^3$ ) as well as between 3+ and 1+ samples ( $p < 0.0001$ ). Negative cases and 2+ also presented a significant relationship,  $p = 0.0003$  (Figure 2). RLU for normal breast tissues was  $27,064 \times 10^3 \pm 2,060 \times 10$ .

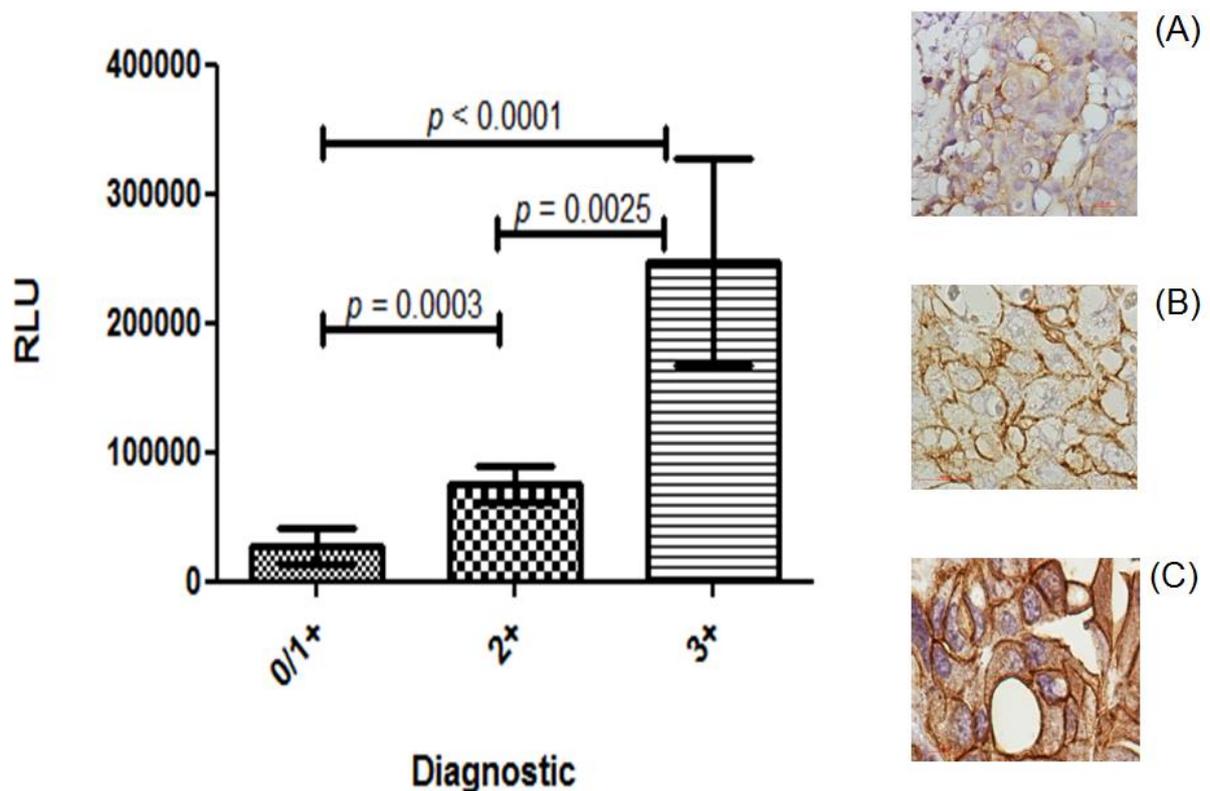


Figure 2: Immunohistochemistry and Chemiluminescence of IDC with anti-HER-2-AE. Statistical analysis of RLU (mean of triplicate) of 0/1+ (A) – 400x (n=6), 2+ (B) – 1000x (n=5) and 3+ (C) – 1000x (n=7) patients.

Studies using Concanavalin A lectin (Con A), specific to glucose/mannose, conjugated to AE established that there is a difference in RLU between normal and IDC [2]. Subsequently recent studies of Brustein *et al* [18], using the same lectin conjugated to

EA reported a difference in RLU between two types of breast tumors where IDC RLU was lower than tissues diagnosed with fibroadenoma (a benign tumor).

Patients who present IDC with HER-2 overexpression have more aggressive tumor progression, a high degree of malignancy, metastasis and poor prognosis [7, 21, 22]. In our study, these features are well evidenced by the analysis tissue versus area RLU in three different types of diagnostics for HER-2 (0 or 1 +, 2 + and 3 +). Positive cases, there is an exponential increase in RLU, indicating a high degree of malignancy in which the RLU increases with the size of tumor affected by the HER-2 positive cells (Figure 3). Patients with this profile have the ability to present lymph node metastases, and a decrease in overall survival and disease-free survival [23]. In negatives and indeterminate cases was observed a linear increase profile in RLU, which are less aggressive tumors when compared to 3+ patients. Similar results were observed in other studies in our laboratory for IDC [2, 18] and fibroadenoma [18] using lectin conjugated to AE.

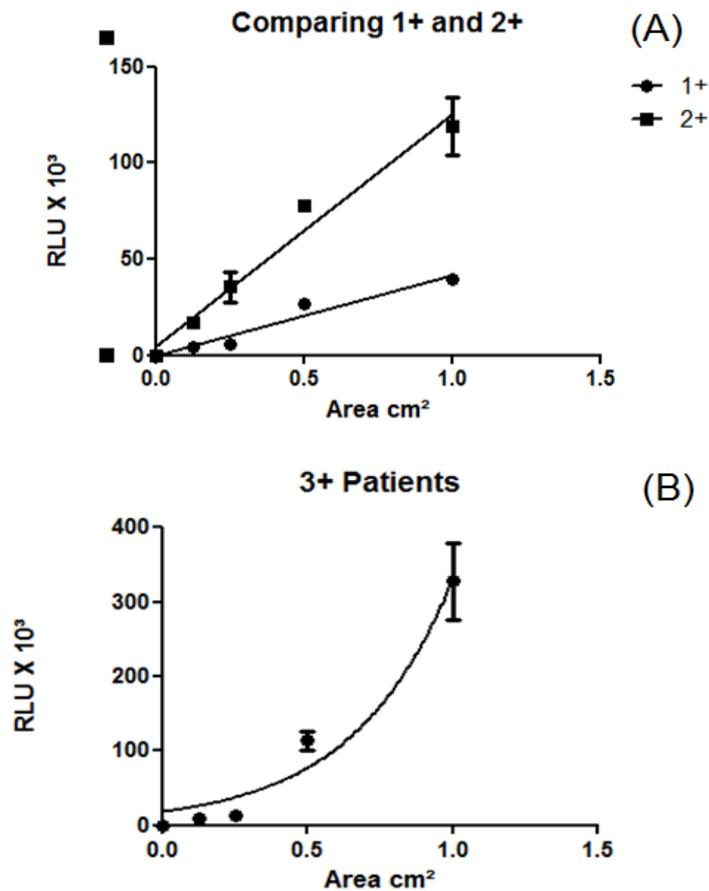


Figure 3: Tissue area versus RLU: (A) linear relationship between 0/1+ ( $r^2 = 0.9517$ ) and 2+ ( $r^2 = 0.9743$ ) patients; (B) exponential relationship for 3+ patients.

These findings confirm the effectiveness of this new technique in the face of previous studies that made use of routine techniques such as immunohistochemistry and FISH.

In clinical practice, HER-2 overexpression is considered a predictive marker to determine which patients can use the treatment with humanized monoclonal antibody (Trastuzumab<sup>®</sup>) which has a satisfactory response to targeted therapy [24]. The use of Trastuzumab<sup>®</sup> as monotherapy or in combination with other drugs has significantly

improved rates of progression, overall survival and life quality of patients with breast cancer in early stages [24, 25]. Due the benefits of treatment with Trastuzumab® is highly associated with HER-2 status, professional associations recommend the use of tests for HER-2 detection, but both techniques approved by the US Food and Drug Administration (FDA), IHC and FISH, still have limitations such as low reliability and high cost [24, 26].

The high cost of this drug has fueled the determination of new guidelines for diagnosis considering the limitations of current techniques [26]. In our study, the results reliability and relatively low cost, allows the use of the method as a new tool for laboratory analysis in HER-2 detection, contributing to the correct directing of target therapies in this human mammary tumor.

Our results indicate that it is possible to establish a correlation between IHC and immunohistochemiluminometric results, where patients with 3+ exhibited the highest RLU, proving the effectiveness of the CL method. Analysis of RLU and tissue area demonstrated that the area is an important parameter for chemiluminescence detection under the conditions established in this study using anti-HER-2 conjugated to AE. These results provide satisfactory data and contribute significantly to the quantification of cell surface antigens present in IDC tumors being immunohistochemiluminescence an important diagnostic and therapeutic tool for this type of neoplasia.

## Acknowledgments

Authors thank to CNPq, CAPES and FACEPE for financial support as well as to Sinara Almeida and Luiza Lima by their technical assistance.

## References

1. Fan, A., Cao, Z., Li, H., Kai, M. & Lu, J. (2009). Chemiluminescence Platforms in Immunoassay and DNA Analyses. *Analytical Sciences*, 25, 587-597.
2. Campos, L.M., Cavalcanti, C.B.L., Lima-Filho, J.L., Carvalho-Junior, L.B., Beltrão, E.I. (2006). Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*, 11, 480-484.
3. Natrajan, A., Sharpe, D., Costello, J. & Jiang, Q. (2011). Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output. *Analytical Biochemistry*, 406, 204–213.
4. Yang, M., Liu, C., Hu, X., He, P. & Fang, Y. (2002). Electrochemiluminescence assay for the detection of acridinium esters. *Analytica Chimica Acta*, 461, 141-146.
5. Kricka, L.J. (2003). Clinical applications of chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, 500, 279-386.
6. Utikal, J., Schadendorf, D. & Ugurel, S. (2007). Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res*, 298, 469–477.
7. Ahn, E.R. & Vogel, C.L. (2012). Dual HER2-targeted approaches in HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 131, 371–383.

8. Veiga, R.K.A., Melo-Júnior, M.R., Araújo-Filho, J.L.S., Lins, C.A.B. & Teles, N. (2009). Avaliação digital comparativa da expressão tecidual da proteína cerbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais da mama. *J Bras Patol Med Lab*, 45, 131-137.
9. Nunes, C.B., Rocha, R.M., Gouvêa, A.P., Tafuri, L.S.A., Marinho, V.F.Z., Rezende, M.A., Gobbi, H. (2007). Concordância interobservador na interpretação imunohistoquímica da superexpressão do Her2 detectada por cinco diferentes anticorpos em array de carcinomas mamários. *J Bras Patol Med Lab*, 43, 373-379.
10. Matos, L.L., Trufelli, D.C., Matos, M.G.L. & Pinhal, M.A.S. (2010). Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarker Insights*, 5, 9-20.
11. Guardigli, M., Marangi, M., Casanova, S., Grigioni, W.F., Roda, E. & Roda, A. (2005). Chemiluminescence Quantitative Immunohistochemical Determination of MRP2 in Liver Biopsies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53, 1451–1457.
12. Sezgin Ramadan, S., Yapicier, O., Kihtir, S., Erdemir, A., Dogan, T.H., Üskent, I.N.H., Onat, H. & Çakmakçi, M. (2011). Correlation of HER 2/neu Gene Amplification with Immunohistochemistry and Other Prognostic Factors in Breast Carcinoma. *Turkish Journal of Pathology*, 27, 196-203.
13. Ugiagbe, E.E., Olu-Eddo, A.N. & Obaseki, D.E. (2011). Immunohistochemical detection of Her-2/neu overexpression in breast carcinoma in Nigerians: A 5-years retrospective study. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 14, 332-337.

14. Ellis, I. O., Bartlett, J., Dowsett, M., Humphreys, S., Jasani, B., Miller, K., Pinder, S.E., Rhodes, A. & Walker, R. (2004). Best Practice No 176: updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol*, 57, 233-7.
15. Wolff, A. C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., McShane, L.M., Paik, S., Pegram, M.D., Perez, E.A., Press, M.F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S.E., Tubbs, R., Vance, G.H., van de Vijver, M., Wheeler, T.M. & Hayes, D.F. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 25, 118-45.
16. Lebeau, A., Deimling, D., Kaltz, C., Sendelhofert, A., Iff, A., Luthardt, B., Untch, M. & Lohrs, U. (2001). HER-2 /neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: Comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol*, 19: 354-363.
17. Gown, A.M. (2008). Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Modern Pathology*, 21, 8-15.
18. Brustein, V.P., Cavalcanti, C.L.B., Melo-Junior, M.R., Correia, M.T.S., Beltrão, E.I.C. & Carvalho, L.B. (2011). Chemiluminescent Detection of Carbohydrates in the Tumoral Breast Diseases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165, 3-4.
19. Araújo-Filho, J.L.S., Melo-Junior, M.R. & Carvalho Jr, L.B. (2011). Potential Applications of the Chemiluminescent Methods in Tumoral Diseases Investigation. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 392-400.

20. Weeks, I., Beheshtl, I., McCapra, F., Campbell, A.K., Woodhead, S.J. (1983). Acridinium Esters as High-Specific-Activity Labels in Immunoassay. *Clin. Chem*, 29, 1474-1479.
21. Velasco, I.B.G., Coutiño, R., Martínez, G., Cruz, P.H. (2008). Marcadores Glicosilados en Cáncer de Mama. *REB*, 27, 52-59.
22. Duffy, M.J., O'Donovan, N., Crown, J. (2011). Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *Cancer Treatment Reviews*, 37, 151–159.
23. Bagaria, S.P., et al. (2012). Prognostic Value of Basal Phenotype in HER2-overexpressing Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 19, 935-940.
24. Ahmed, S.S., et al. HER2/neu revisited: quality and interpretive issues. *Journal of Clinical Pathology*. v. 64, p. 120-124, 2011.
25. Smith, I., Procter, M., Gelber, R.D., et al. (2007). 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomized controlled trial. *Lancet*, 369, 29-36.
26. Haas, S.J., et al. (2011). Genomic Testing and Therapies for Breast Cancer in Clinical Practice. *Journal of Oncology Practice*, 7, 1-7.

## 7 CONCLUSÕES

- A conjugação do anticorpo anti-HER-2 ao éster de acridina e sua purificação usando Sephadex G-25 foram eficientes;
- As amostras avaliadas (CDI e tecido normal de mama humana) foram marcadas diferenciadamente quanto ao status de HER-2 e o tecido na imunoquimiluminescência;
- A relação área tecidual versus URL mostrou uma relação linear e exponencial para os casos de CDI 1+ e 2+; e 3+, respectivamente;
- A análise quimioluminescente se mostrou eficiente na quantificação dos três diferentes status de expressão de HER-2 fornecidos pela imunohistoquímica empregando o mesmo anticorpo;
- A imunoquimiluminescência com anti-HER-2-EA mostrou-se uma ferramenta de diagnóstica quantitativa para o carcinoma ductal invasivo.

## 8 ANEXO

### INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Submissions may be made online using Springer's Editorial Manager electronic submission site at <http://abab.edmgr.com>. First-time users will need to Register before submitting a manuscript. If you experience any problems, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

#### Manuscripts

- Type manuscript in English, double-spaced on numbered pages with 1- to 1.5-inch margins. Please prepare the article as a Microsoft Word document. See the Computer Graphics section for figure specifications.
- A cover letter must accompany the submission giving the rationale for publication in Applied Biochemistry and Biotechnology, particularly with respect to the originality, scientific merit and importance to the field of Applied Biochemistry and Biotechnology. Author(s) also are required to provide names and contact information (mailing address, phone and fax numbers, and e-mail address) of at least three experts in the field as potential reviewers for the manuscript. Please do not suggest anyone who may have a conflict of interest in reviewing your manuscript, such as former advisors, students, or recent collaborators.

#### Abstracts

Abstracts should be 100–200 words.

#### Index Entries

Include 5–10 index entries/key words.

## Artwork

- Number figures consecutively with Arabic numerals, callouts (if any) should be lowercase letters. Include figure captions. All figures must be cited in text; figures will be placed as close as possible to the first text citation.

Include figure captions on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. All illustrations, including chemical structures, must be provided in professional-quality, finished form ready for direct reproduction without revision by us.

- Photographs should be of high quality and with strong contrasts to withstand some reduction. Please indicate the magnification by a rule on the photograph. Additional specifications apply regarding Computer Graphics and Color Art.
- Computer Graphics: If your submission includes Computer Graphics, acceptable software formats are: Adobe Illustrator and Adobe Photoshop v5 and up. File formats are as follows: EPS (Encapsulated Postscript), TIFF, JPEG (high-quality, low-compression) and those native software formats listed above. Unfortunately we cannot accept Microsoft PowerPoint files at this time. dpi specifications: line art should be no less than 1200 dpi; halftone scans should be 300 dpi.
- Color Art: Color art cannot be accepted unless the author is willing to assume the additional production costs involved; quotes given on request.

## Nomenclature

Authors should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. All abbreviations should be fully defined in the text.

## Tables

Type on separate pages. Number consecutively with Arabic numerals in order of mention in the text. Provide titles for all tables.

## References

Cite in the text by italic Arabic numerals in parentheses, set on the text line, numbered in the order they appear. List at the end of the paper in consecutive order. Please follow the style indicated below:

- Journal reference: 1. Haselbeck, A. and Hösel, W. (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 42, 207–219.
- Chapter in book: 2. Gaastra, W. (1984), in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2: *Nucleic Acids* (Walker, J. M.,ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 333–341.
- Book reference: 3. Franks, F. (1993) *Protein Biotechnology*, 2nd ed., Humana, Totowa, NJ.
- Report/Document: 4. Macgregor, S. (1993), PhD thesis, University of Hertfordshire, Hatfield, UK.
- Online: 5. Cancer Facts and Figures 2006. Available from: [www.cancer.org](http://www.cancer.org). Accessed December 31, 2006.

## Page Charges

There are NO page charges for accepted articles.

## DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your

manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in:

Medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

### Reprints

Reprints and/or a final PDF file are available to authors at standard rates when ordered prior to publication.