

Imunohistoquímica no Diagnóstico da Glomerulonefrite Membranosa: Estudo Comparativo de Binômios Cromogênio + Coloração de Contraste

Ana C. Reis¹, Susana C. Dias¹, Ana R. Santos^{1,2}, Amadeu Borges Ferro¹

1 – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

2 – Laboratório de Morfologia Renal. Serviço de Nefrologia, Hospital Curry Cabral. Centro Hospitalar de Lisboa Central

Resumo

Imunohistoquímica no diagnóstico da glomerulonefrite membranosa: estudo comparativo de binômios cromogênio + coloração de contraste

A glomerulonefrite membranosa faz parte das doenças glomerulares que provocam glomerulonefrite crônica, apresentando-se como uma das causas da doença renal terminal. As técnicas de imunofluorescência são o *gold standard* no estudo imunológico desta patologia em biópsia renal, através da deteção de imunocomplexos (e.g. IgG e C3) e do seu padrão de distribuição granular característico. No entanto, a imunofluorescência não permite uma contextualização histológica e os fluorocromos utilizados possuem um reduzido tempo de atividade, ao contrário das técnicas imunoenzimáticas que utilizam cromogénios coloridos precipitados que permitem a obtenção de uma marcação permanente e a sua contextualização histológica por via da utilização de eficientes colorações de contraste.

Com a finalidade de contribuir para a qualidade do diagnóstico da glomerulonefrite membranosa, em biópsias renais, procurou-se, com esta pesquisa, identificar uma técnica imunoenzimática, através da conjugação entre diferentes cromogénios e colorações de contraste, que permita a deteção de depósitos de IgG e C3, com padrão granular.

Foram constituídos diferentes binômios cromogênio + coloração, com os cromogénios 3,3'- Diaminobenzidine Tetrahydrochloride e 3-Amino-9-ethylcarbazole e as colorações *Periodic Acid Schiff*, *Periodic Acid Methenamine Silver* e Hematoxilina. Foram utilizadas 72 secções de tecido provenientes de seis de casos de biópsias renais com diagnóstico de glomerulonefrite membranosa, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina. A recolha de dados foi realizada por observação microscópica com preenchimento de uma grelha de classificação dos parâmetros: preservação da morfologia, intensidade da marcação específica, quantidade relativa de estruturas marcadas, marcação inespecífica/fundo, contraste e padrão da marcação, que permitiu a classificação dos binômios estudados num *score* quantitativo de 0-100 pontos.

O binômio que apresentou melhores resultados foi 3-Amino-9-ethylcarbazole + Hematoxilina (*score* 71,81) e o binômio 3,3'- Diaminobenzidine Tetrahydrochloride+*Periodic Acid Methenamine Silver* (*score* 7,81), apresentou os piores resultados. O resultado do teste *Kruskal-Wallis* indica-nos a presença de diferenças estatísticas entre os binômios em estudo ($p=0,000$).

Summary

Immunohistochemistry in the diagnosis of membranous glomerulonephritis: a comparative study of chromogen + counterstaining combination

Membranous glomerulonephritis is one of the glomerular diseases that induce chronic glomerulonephritis and one of the causes of terminal renal disease.

Immunofluorescence techniques are the gold standard in the immunologic study of this disease in renal biopsy by the detection of the immunocomplexes and their granular specific pattern. However, immunofluorescence does not allow a histological contextualization and the fluorochromes that are used have a reduced timeline, contrary to immunoenzymatic techniques that use colorful chromogens which permit to obtain a permanent stain and a histological contextualization, with the help of efficient counterstaining.

In order to contribute to the quality of diagnosis of membranous glomerulonephritis in renal biopsies, we tried with this research to identify a combination of different chromogens and counterstainings that allows the detection of IgG and C3 deposits with granular pattern.

So we establish different chromogen + counterstaining combination, with 3,3'- Diaminobenzidine Tetrahydrochloride and 3-Amino-9-ethylcarbazole as chromogens and *Periodic Acid Schiff*, *Periodic Acid Methenamine Silver* and Hematoxilin as counterstainings.

We used 72 sections of 6 renal biopsies with membranous glomerulonephritis, formalin-fixed and paraffin-embedded. Data collection was performed by completing an assessment grid with parameters: preservation of morphology, intensity of specific staining, relative amount of labeled structures, nonspecific staining / background contrast and pattern of staining, which allowed the assignment of a 0-100 points quantitative score.

3-Amino-9-ethylcarbazole+Hematoxilin was the combination that accomplish the higher score (71,81) and 3,3'- Diaminobenzidine Tetrahydrochloride+ *Periodic Acid Methenamine Silver* the worst (7,81). *Kruskal-Wallis* test show us that exist statistical difference between the combinations in study ($p=0,000$).

A Hematoxilina pode ser considerada a coloração mais eficaz, pois cumpriu a sua função de auxiliar e facilitar a observação do tipo de padrão com os dois cromogênios utilizados. O cromogênio 3-Amino-9-ethylcarbazole apresentou resultados semelhantes aos produzidos pelo 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, no entanto, permitiu identificar em todos os casos o padrão granular de imunomarcção, ao contrário do que aconteceu com este último.

Palavras-chave: Glomerulonefrite membranosa, imunohistoquímica

Hematoxilin was the most versatile counterstaining, because it help and facilitate the observation of the pattern produced by the two chromogen used. The chromogen 3-Amino-9-ethylcarbazole presented similar results to 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, but, with the first one, all cases were evaluated as granular pattern unlike what happen with the last one.

Keywords: Membranous glomerulonephritis, immunohistochemistry

Introdução

A glomerulonefrite membranosa (GM) faz parte das doenças glomerulares que provocam glomerulonefrite crônica, apresentando-se como uma das causas da doença renal terminal e a causa mais comum de síndrome nefrótica na população adulta (1-3). A GM é uma doença autoimune órgão-específica caracterizada pela presença de depósitos de complexos imunes subepiteliais, nomeadamente IgG e C3, que provocam um aumento da membrana basal do glomérulo e a lesão dos podócitos, sendo característica a presença de espículas (2, 4-7). Esta patologia possui cinco estádios diferentes, consoante à evolução das alterações no espessamento da parede, em consequência da acumulação dos depósitos de complexos imunes (1, 5, 6). Para o seu diagnóstico é necessário detectar o aumento da espessura da membrana basal, a presença de espículas e identificar a presença de depósitos granulares dos complexos imunes, através da conjugação de informações fornecidas pela microscopia ótica, pela microscopia eletrônica e pelas técnicas de imunohistoquímica (IHQ), sendo a imunofluorescência a mais utilizada (2,4-6).

As técnicas de IHQ permitem a deteção de estruturas tecidulares in situ, através de reações específicas entre antígeno e anticorpo, conferindo fluorescência, cor ou eletrodensidade aos alvos a estudar, sendo possível a sua observação microscópica (8). Estas técnicas surgiram em 1941, pela mão de Albert Coons e seus colaboradores,

que desenvolveram a variante de imunofluorescência, que recorre a moléculas fluorescentes para identificar a presença de compostos alvo (9). Posteriormente, foram introduzidas técnicas imunoenzimáticas que utilizam como marcadores ou moléculas-repórter, as enzimas e que permitiram a obtenção de resultados sensíveis e intensos (10). Estas técnicas utilizam reações entre a enzima e o seu substrato para obter produtos finais coloridos a partir de cromogênios incolores.

Como tal, cada enzima possui os seus substratos e cromogênios específicos, sendo que a mais utilizada, denominada Horseradish Peroxidase (HRP), tem como substrato o peróxido de hidrogênio e como cromogênios mais utilizados a 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB), que forma um precipitado castanho, e o 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), que se deposita no local de ligação entre antígeno-anticorpo sob a forma de um composto avermelhado (10, 11).

Devido aos seus resultados minuciosos em pormenor e exuberantes em intensidade, as técnicas de imunofluorescência são, tradicionalmente, utilizadas nos laboratórios de Anatomia Patológica no diagnóstico de doenças glomerulares imunomediadas, no entanto, apresentam algumas desvantagens face às técnicas imunoenzimáticas (10, 12-16):

- Não permitem contextualização com informação histológica permitida por técnicas de coloração histoquímica
- Existência de fenômenos de bleaching/dimming que forçam a criação de arquivo fotográfico

- Obrigam à colheita de dois fragmentos ou a divisão do fragmento colhido em dois, seguindo um para inclusão em parafina e outro para congelação

- É necessário microscópio de fluorescência para a visualização.

Na generalidade, os resultados obtidos pelas técnicas imunoenzimáticas são considerados consistentes e equivalentes em fidelidade aos obtidos por imunofluorescência (13, 15, 17).

Sempre que é importante fazer a contextualização da IHQ com a informação histológica, recorre-se a técnicas de coloração histoquímica, que identificam a natureza química dos constituintes celulares através da utilização de substâncias que reagem com os mesmos, obtendo-se um produto colorido (10). De entre estas metodologias destacam-se:

- Hematoxilina - corante natural que confere uma tonalidade azul celeste aos núcleos e outras estruturas basófilas. A variante de Mayer é obtida por oxidação química com iodato de sódio (10).

- Periodic Acid Schiff (PAS) - coloração utilizada na evidênciação de hidratos de carbono, permitindo que estes obtenham uma cor magenta e que núcleos e mucinas ácidas corem de azul. Em biópsias renais, esta técnica permite analisar a espessura da membrana basal (18).

- Periodic Acid Methenamine Silver (PAMS) - coloração argêntica que evidencia as fibras de reticulina, permitindo a visualização da membrana basal em amostras renais. Obtém-se uma definição superior à obtida pela técnica de PAS (10, 12, 18, 19). Da sua aplicação obtêm-se fibras de reticulina, membra-

nas basais e algumas bactérias coradas de negro (18, 20).

Neste contexto, o presente trabalho procura contribuir para o incremento da qualidade do diagnóstico da glomerulonefrite membranosa, identificando o binômio cromogênio + coloração de contraste que produz os melhores resultados na detecção de depósitos granulares dos complexos imunes de IgG e de complemento C3, em biópsias renais fixadas em formalina 10% e incluídas em parafina.

Materiais e Métodos

Foram utilizados seis casos de biópsias renais com glomerulonefrite membranosa, no estágio II, fixadas em formalina a 10% e incluídas em parafina. De cada caso foram obtidos 12 secções seriadas (total 72 secções), com a espessura de 3 µm. Nestas secções foram realizadas técnicas de coloração e de IHQ, tendo sido constituídos seis binômios diferentes, agrupados tendo em conta os cromogênios e colorações de contraste estudadas - DAB+PAS; DAB+PAMS; DAB+Hematoxilina; AEC+PAS; AEC+PAMS; AEC+Hematoxilina.

Os casos que requeriam coloração PAS e PAMS foram corados previamente, sendo que no primeiro caso as secções foram submetidas a ácido periódico a 0,5% por 15 minutos, seguindo-se o reagente Schiff por 10 minutos (18). Para a coloração PAMS, as secções foram submetidas a ácido periódico a 0,5% por 5 minutos, seguindo-se uma incubação com solução metenamina-prata durante 5 minutos, a 60°C em banho-maria. A solução de metenamina-prata foi preparada imediatamente antes da sua utilização, a partir de uma solução de metenamina a 3% e nitrato de prata a 5%, através da adição de bórax a 5%. Após a incubação, colocou-se cloreto de ouro a 0,2% durante 2 minutos e finalizou-se a técnica com a incubação com tiosulfato de sódio a 3% durante 30 segundos(20).

Para a realização da IHQ foi utilizado o micropolímero de enzimas UltraVision ONE Detection System: HRP Polymer

(Thermo Scientific® TL-125-HLJ), tendo sido introduzidos controles positivos e negativos.

Procedeu-se à recuperação antigênica por digestão enzimática com proteínase bacterial XXIV (Sigma-Aldrich® P8038), durante 20 minutos a 37°C, em todas as lâminas produzidas. Posteriormente realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena - Peroxido de hidrogênio (Thermo Scientific® TA-125-HP) e o bloqueio proteico - Ultra V Block (Thermo Scientific® TA-125-UB).

A incubação dos soros primários Policlonal Rabbit Anti-Human IgG/Fitc (Dako® F0202) a diluição 1:30, e Policlonal Rabbit Anti-Human C3c Complement/Fitc (Dako® F0201) a diluição 1:5, ocorreu durante 5 minutos. Após esta incubação, foi colocado o Primary Antibody Enhancer (Thermo Scientific® TL-125-PB) e, de seguida, o micropolímero de enzimas (Thermo Scientific® TL-125-PHJ), durante 10 e 30 minutos, respetivamente. Realizou-se a revelação das lâminas com os cromogênios DAB (Dako® K3468) e AEC (Invitrogen® 002007), conforme os binômios pré-definidos. De seguida, apenas os cortes em que não se realizou nenhuma coloração histoquímica previamente, foram corados com hematoxilina de Mayer durante 1 minuto. Por fim, todas as lâminas que utilizaram DAB como cromogênio foram desidratadas e montadas com meio sintético Entellan® (Merck Milipore® 107961) e as que utilizaram cromo-

gênio AEC, foram montadas com meio aquoso Glycergel® Mounting Medium (Dako® C0563) - Figura 1.

A qualidade final de cada binômio foi quantificada com recurso a observação microscópica e preenchimento, por parte de três observadores externos, de uma tabela de avaliação composta por vários parâmetros que foram classificados de 0 a 4 pontos, estando o valor 0 associado ao pior resultado possível e o valor 4 associado ao melhor resultado possível. O score final de cada binômio resulta da soma das pontuações atribuídas a cada parâmetro, multiplicadas pelo fator de ponderação proporcional à sua importância: (contraste x 6) + (tipo de padrão x 6) + (intensidade de marcação IHQ x 5) + (quantidade de células marcadas x 4) + (marcação inespecífica/fundo x 2) + (preservação da morfologia x 2). Desta forma o score final de cada caso pode variar entre 0 a 100 pontos.

Finalmente os diferentes binômios foram comparados com o auxílio de técnicas estatísticas não paramétricas, mais concretamente através do teste Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$).

Durante a concepção e realização deste trabalho de investigação procurou-se manter os valores de ética, que direcionam a nossa conduta. O anonimato e confidencialidade foram garantidos e as amostras utilizadas foram provenientes do arquivo, o que não implicou a realização de procedimentos invasivos, garantindo-se o direito à proteção contra o desconforto e o prejuízo.

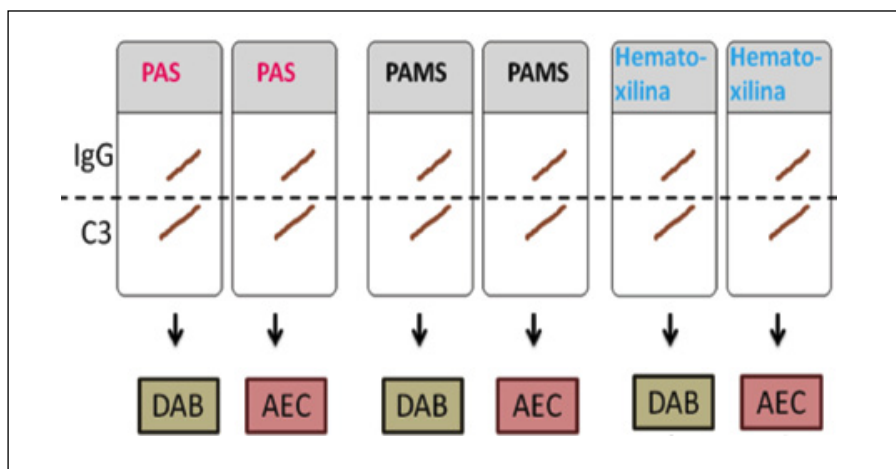


Figura 1. Plano metodológico

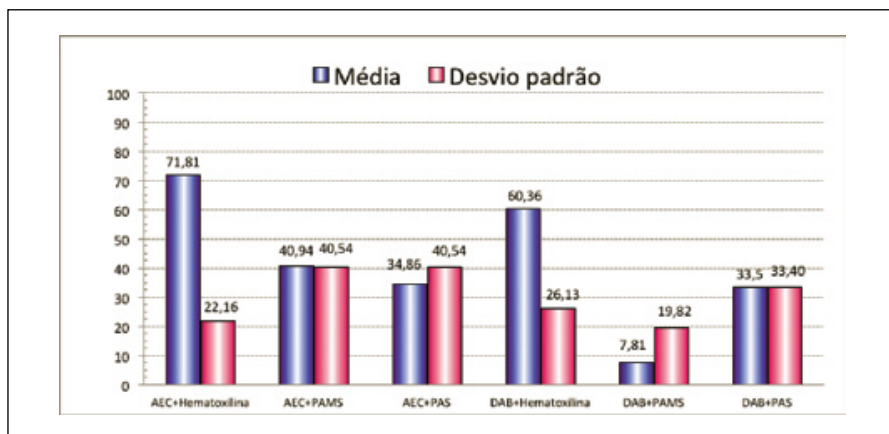


Gráfico 1. Média e desvio padrão dos scores finais por binômio

Tabela 1. Resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis

HO	Teste	Sig.	Decisão
Não há diferenças relativamente aos scores obtidos pelos diferentes binômios	Teste Kruskal-Wallis	0,000	Rejeição de HO

Resultados

O binômio AEC+Hematoxilina apresentou, em média, um score final de 71,81, enquanto o binômio DAB+Hematoxilina apresentou 60,36. Os binômios AEC+PAMS e DAB+PAMS atingiram os scores de 40,94 e 7,81, respectivamente. Finalmente AEC+PAS e DAB+PAS foram classificados em 34,86 e 33,5. Apenas os binômios onde se utilizou Hematoxilina como contraste obtiveram um score final superior a 50. Relativamente à dispersão dos resultados o binômio DAB+PAMS obteve o valor mais baixo de desvio padrão (19,82), tendo os binômios AEC+PAMS e AEC+PAS obtido o valor mais elevado (40,54) – Gráfico 1.

O resultado do teste Kruskal-Wallis indica-nos a presença de diferenças estatísticas entre os binômios em estudo ($p=0,000$) – Tabela 1.

Considerações Finais

Apenas as conjugações com Hematoxilina apresentaram valores de score final superior a 50, tendo sido a sua conjugação com o cromogênio

Hematoxilina enquanto contraste produz resultados superiores aos obtidos pelas restantes colorações de contraste utilizadas. Por um lado, a sua utilização permite a realização da técnica num período de tempo mais reduzido, mas também uma maior possibilidade de conjugação com os cromogênios testados, sendo possível com esta coloração obter-se um bom contraste nos dois casos.

A utilização de AEC+PAMS permitiu-nos obter uma média de score final perto do valor médio da escala. Esta situação permite-nos afirmar que o contraste PAMS foi mais efetivo na sua função de facilitador da visualização da marcação IHQ quando conjugado com o cromogênio AEC, do que com o cromogênio DAB, tal como era esperado devido às diferenças de tonalidades obtidas (Figura 4 e Figura 5). No entanto, o valor médio de scores obtido por este binômio encontra-se ainda longe do pretendido. A obtenção de um valor médio superior às combinações com PAS também era esperado, porque a utilização da técnica PAMS permite a obtenção de uma

AEC a que obteve melhores resultados (Figura 2 e Figura 3). Desta forma é possível afirmar que a utilização de

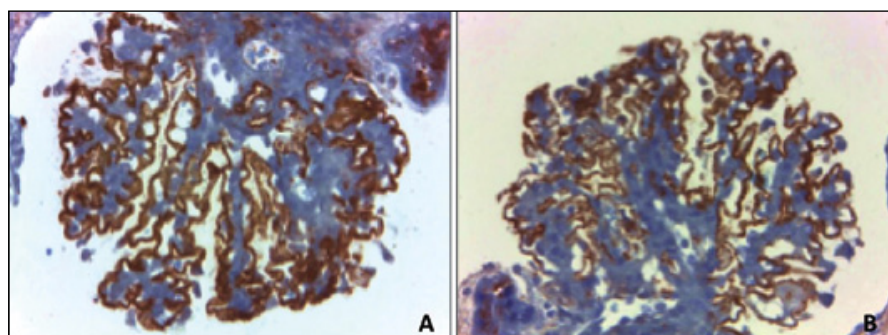


Figura 2. Binômio AEC+Hematoxilina 400x (A -Rabbit Anti-Human IgG; B - Rabbit Anti-Human C3c Complement)

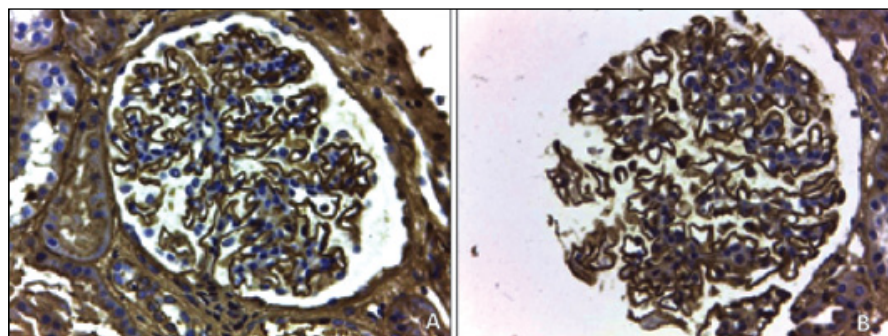


Figura 3. Binômio DAB+Hematoxilina 400x (A -Rabbit Anti-Human IgG; B - Rabbit Anti-Human C3c Complement)

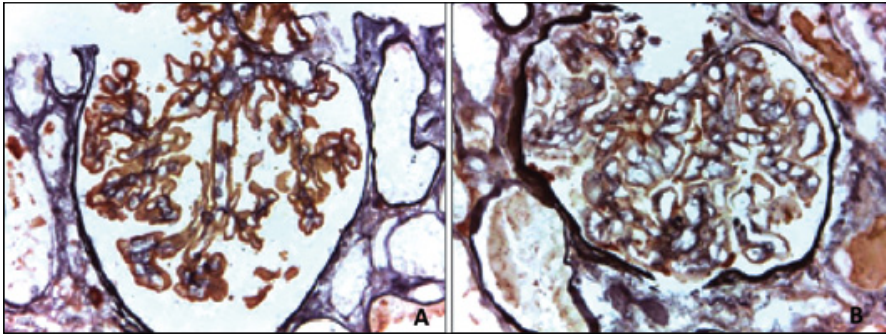


Figura 4. Binômio AEC+PAMS 400x (A -Rabbit Anti-Human IgG; B - Rabbit Anti-Human C3c Complement)

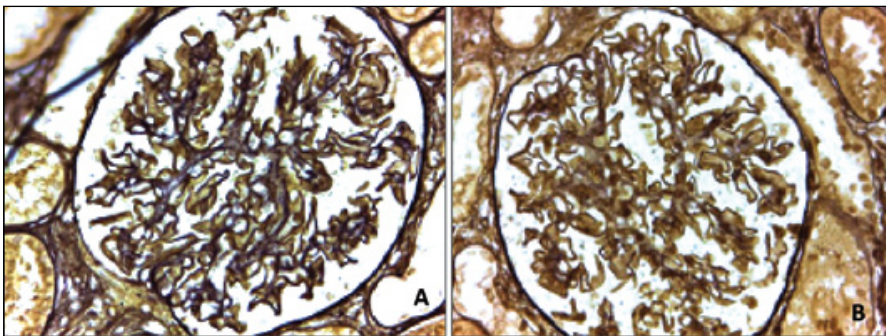


Figura 5. Binômio DAB+PAMS 400x (A - Rabbit Anti-Human IgG; B - Rabbit Anti-Human C3c Complement)

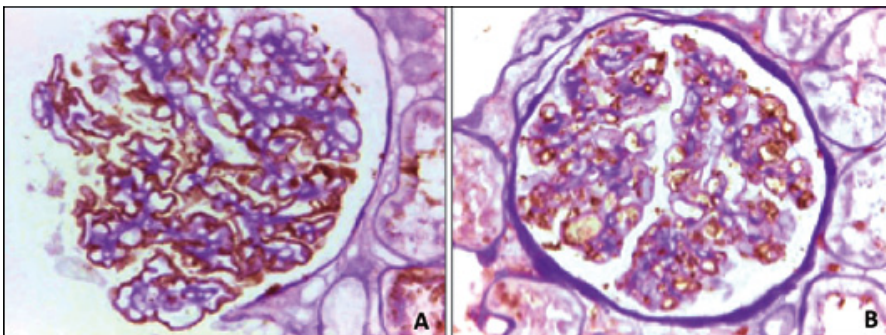


Figura 6. Binômio AEC+PAS 400x (A - Rabbit Anti-Human IgG; B - Rabbit Anti-Human C3c Complement)

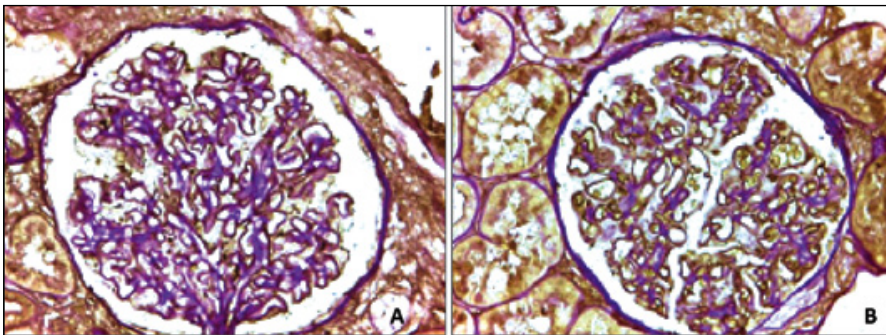


Figura 7. Binômio DAB+PAS 400x (A -Rabbit Anti-Human IgG; B - Rabbit Anti-Human C3c Complement)

definição de membrana basal superior à técnica de PAS (10, 12, 19).

A técnica histoquímica PAS apresentou resultados bastante semelhantes, e inferiores ao esperado, com ambos os cromogênios. No caso do AEC+PAS como as tonalidades resultantes das diferentes técnicas são semelhantes (rósea do PAS e vermelho do AEC) era esperada a obtenção de um resultado pobre (Figura 6). Porém, no binômio DAB+PAS, devido à diferença de tonalidades obtidas entre a técnica histoquímica e o cromogênio, era esperado a obtenção de um contraste elevado e facilitador da observação microscópica da marcação IHQ obtida, mas tal não ocorreu (Figura 7).

O binômio DAB+PAMS obteve o pior score, podendo este facto estar também relacionado com as tonalidades resultantes da aplicação destas técnicas (cinza/negro do PAMS e castanho do DAB), que não permitiram a obtenção de um contraste esclarecedor e delimitador da marcação IHQ e o restante tecido - Figura 5.

Concluindo, o binômio que apresentou melhores resultados foi AEC+Hematoxilina, tendo sido a hematoxilina a coloração histoquímica que permitiu a obtenção dos melhores resultados. Em todos os binômios, com exceção do DAB+PAMS, foram observados depósitos granulares dos complexos imunes, característica da patologia em estudo.

Tendo em conta que foi utilizado um método IHQ de micropolímero de enzimas, que, por possuir um elevado poder de amplificação (21), poderá condicionar a observação do pormenor/detalhe da imunomarcação, sugere-se que, num estudo futuro, se realize uma profunda otimização do protocolo da técnica de forma a garantir a determinação exata do padrão de marcação, procurando assim garantir uma ainda maior eficiência da aplicação destas técnicas.

Através da utilização de técnicas imunoenzimáticas na deteção de depósitos de complexos imunes é possível o armazenamento das lâminas produzidas e a sua posterior

consulta física. Sabendo que, as biópsias renais são uma ferramenta importante para o estabelecimento de um diagnóstico, prognóstico ou indicação terapêutica, o fato de estas técnicas auxiliarem a construção de novo conhecimento científico,

demonstra-se deveras benéfico e vantajoso para o paciente.

Agradecimentos

Ao Dr. Fernando Nolasco, Diretor do Serviço de Nefrologia do Hospital Curry Cabral (Lisboa), que, gen-

tilmente, nos cedeu o espaço e os materiais que tornaram possível a realização deste trabalho.

Correspondência para:

Amadeu Borges Ferro
amadeu.ferro@estesl.ipl.pt

Referências Bibliográficas

1. Nasr SH, Said SM, Valeri AM, Stokes MB, Masani NN, D'Agati VD, et al. Membranous glomerulonephritis with ANCA-associated necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Feb; 4(2):299–308.
2. Satoskar AA, Kovach P, O'Reilly K, Nadasdy T. An uncommon cause of membranous glomerulonephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 2010 Feb; 55(2):386–90.
3. Uramatsu T, Furusu A, Nishino T, Obata Y, Kanamoto Y, Komuro S, et al. Membranous nephropathy complicating nasopharyngeal carcinoma. *Intern. Med.* 2010;49(6):585–8.
4. Ghosh B, Pande A, Ghosh A, Banerjee A, Saha S. Membranous glomerulonephritis and tuberculous peritonitis: a rare association. *J Infect Dev Ctries.* 2011 Jul; 5(7):550–2.
5. Fervenza FC, Sethi S, Specks U. Idiopathic membranous nephropathy: diagnosis and treatment. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 May; 3(3):905–19.
6. Ulrich W. Membranous glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996 Oct; 11(10):2099–100.
7. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 7th ed. Saunders; 2011.
8. Polak JM, Van Noorden S. *Introduction to immunocytochemistry.* Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2003.
9. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1941 Jun 1;47(2): 200–2.
10. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*, 6e. 6th ed. London [etc.]: Churchill Livingstone; 2007.
11. Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005 Jul 1; 42(4): 405–26.
12. Furness PN. Acp. Best practice no 160. Renal biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 2000 Jun; 53(6): 433–8.
13. Howie AJ, Gregory J, Thompson RA, Adkins MA, Niblett AJ. Technical improvements in the immunoperoxidase study of renal biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 1990 Mar; 43(3): 257–9.
14. Mölne J, Breimer ME, Svalander CT. Immunoperoxidase versus immunofluorescence in the assessment of human renal biopsies. *Am. J. Kidney Dis.* 2005 Apr; 45(4): 674–83.
15. Walker PD, Cavallo T, Bonsib SM. Practice guidelines for the renal biopsy. *Mod. Pathol.* 2004 Dec; 17(12):1555–63.
16. Furness PN, Boyd S. Electron microscopy and immunocytochemistry in the assessment of renal biopsy specimens: actual and optimal practice. *J. Clin. Pathol.* 1996 Mar; 49(3):233–7.
17. Karasalihović Z, Iljazović E, Ferluga D, Cickusić E, Mustedanagić Mujanović J, Stahov J, et al. Direct immunofluorescence and immunohistochemistry in diagnostics of glomerulonephritis. *Bosn J Basic Med Sci.* 2008 Feb; 8(1):12–9.
18. Bancroft JD. *Histochemical Technique.* 2nd ed. Butterworth-Heinemann; 1975.
19. Fonseca Ferraz ML, Dos Santos AM, Cavellani CL, Rossi RC, Corrêa RRM, Dos Reis MA, et al. Histochemical and immunohistochemical study of the glomerular development in human fetuses. *Pediatr. Nephrol.* 2008 Feb; 23(2): 257–62.
20. Jones DB. Nephrotic Glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 1957 Apr; 33(2): 313–29.
21. Ferro AB, Rodrigues AM. Amplificação em imunocitoquímica: estudo comparativo de sistemas de polímeros. *Micron.* 2011; (15):16–21.