



IMUNOHISTOQUÍMICA

Amadeu Borges Ferro

IMUNOHISTOQUÍMICA



Autor:

Amadeu Borges Ferro

Editor:

Amadeu Borges Ferro



Este trabalho está licenciado sob uma Licença Creative Commons Atribuição-NãoComercial 4.0 Internacional. Para ver uma cópia desta licença, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

Baseado no trabalho disponível em www.amadeuferro.pt.vu.

Edição: Outubro de 2014

ISBN: 978-989-20-5416-2



AMADEU BORGES FERRO

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

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

Tel: +351-218980400

amadeu.ferro@estesl.ipl.pt

- Bacharel em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.
- CESE em Metodologias do Ensino da Ciências pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Mestre em Educação Médica pela Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.
- Título de Especialista em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica pelo Instituto Politécnico de Lisboa.
- Professor Adjunto da Área Científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.
- Responsável pela Unidade Curricular de Imunocitoquímica da Licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
1 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	1
1.1 Imunohistoquímica e Immunocitoquímica	1
1.2 Definição geral.....	2
1.3 Enquadramento histórico	3
1.4 Principais aplicações.....	6
1.5 Conceptualização da Imunohistoquímica	7
2 ANTIGÉNIO E ANTICORPO.....	9
2.1 Antigénio.....	9
2.2 Imunogénio.....	9
2.3 Anticorpo.....	10
2.3.1 Especificidade e afinidade de um anticorpo	10
2.4 Imunoglobulinas.....	11
2.5 Cadeias leves	14
2.6 Cadeias pesadas	14
2.6.1 Cadeia pesada Alfa.....	14
2.6.2 Cadeia pesada Delta.....	15
2.6.3 Cadeia pesada Epsilon	15
2.6.4 Cadeia pesada Gama	15
2.6.5 Cadeia pesada Miu.....	15
2.7 Forças de ligação entre antigénio e anticorpo	16
2.7.1 Ligação eletrostática ou iónica	16
2.7.2 Pontes de hidrogénio	17
2.7.3 Ligações hidrofóbicas.....	18
2.7.4 Forças de van der Waals	18
3 SOROS POLICLONAIS E MONOCLONAIS.....	19
3.1 Soros Policlonais.....	19
3.1.1 Etapas da produção de Soros Policlonais.....	19
3.1.2 Três tipos de soros policlonais	21
3.2 Soros Monoclonais.....	22
3.2.1 Produção de Soros Monoclonais.....	23
3.3 Soros Monoclonais versus Soros Policlonais.....	28
3.4 Manuseamento de Soros.....	29
3.5 Receção.....	29
3.6 Armazenamento e conservação.....	29
3.6.1 Frascos contentores.....	29
3.6.2 Temperatura.....	29
3.6.3 Manipulação diária.....	30
3.6.4 Azida de sódio	30
4 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	31
4.1 Métodos de Imunofluorescência	31
4.1.1 Fluorocromos	32
4.1.2 União dos fluorocromos a anticorpos.....	34
4.1.3 Microscópio de fluorescência	35

4.1.4	Microscopia de Imunofluorescência no diagnóstico.....	35
5	IMUNOENZIMOLOGIA.....	37
5.1	Enzimologia Básica.....	37
5.1.1	Papel Catalisador.....	38
5.1.2	Características das Enzimas.....	39
5.1.3	Modelos de Interação Enzima/Substrato.....	39
5.1.4	Fatores que afetam a Atividade Enzimática.....	40
5.1.5	Classificação das Enzimas.....	41
5.1.6	Tipos de Inibição.....	42
5.2	Imunoenzimologia.....	42
5.2.1	Horseradish Peroxidase – HRP.....	42
5.2.2	Fosfatase Alcalina (Calf intestine Alkaline Phosphatase);.....	46
5.2.3	Glucose Oxidase (<i>Aspergillus niger</i>).....	48
5.2.4	Contraste.....	49
6	MÉTODOS IMUNOHISTOQUÍMICOS.....	51
6.1	Método Direto.....	51
6.2	Métodos indiretos.....	52
6.2.1	Simples.....	52
6.2.2	Método Peroxidase Anti Peroxidase (PAP).....	52
6.2.3	Método APAAP (Alkaline phosphatase anti Alkaline phosphatase).....	53
6.3	Métodos de avidina-biotina.....	54
6.3.1	Enquadramento histórico.....	54
6.3.2	Principais características da avidina.....	55
6.3.3	Principais características da streptavidina.....	55
6.3.4	Principais características da Biotina.....	56
6.3.5	A ligação entre a avidina e a biotina.....	56
6.3.6	Biotinilação.....	56
6.3.1	Bloqueio da biotina endógena.....	57
6.3.2	Marcação da avidina.....	57
6.3.3	Técnicas imunohistoquímicas de avidina-biotina.....	57
6.3.4	Aplicações práticas.....	59
6.4	Métodos de polímero.....	60
6.4.1	Polímero de esqueleto interno.....	61
6.4.2	Micropolímeros de enzimas.....	64
6.4.3	Sistemas de dois e três passos.....	65
7	ASPETOS PRÁTICOS DOS MÉTODOS.....	67
7.1	Cuidados com material e reagentes.....	67
7.2	Diluição de soros de anticorpos.....	67
7.3	A diluição ideal.....	68
7.4	Teste de diluição de soros de anticorpos.....	68
7.5	Pipetagem.....	69
7.5.1	Cuidados gerais.....	69
7.5.2	Preparação da Micropipeta.....	70
7.5.3	Como retirar uma amostra com uma micropipeta.....	70
7.5.4	Como expelir a amostra da micropipeta.....	72
7.6	Duração da incubação.....	73
7.7	Temperatura de incubação.....	73

7.8	pH	73
7.9	Higiene e segurança no Laboratório	73
8	PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	75
8.1	Fixação em Imunohistoquímica.....	75
8.1.1	Fixação para cortes de crióstato	75
8.1.2	Fixação em Imunohistoquímica de rotina.....	76
8.2	Processamento histológico.....	78
8.3	Preparação de lâminas	79
8.3.1	Cromo-alúmen gel	79
8.3.2	Vectabond.....	80
8.3.3	Lâminas com cargas electrostáticas.....	80
8.3.4	3-Amino-Propil-Trietoxisilane (APES/TESPA/SILANE).....	80
8.4	Microtomia.....	80
9	RECUPERAÇÃO ANTIGÉNICA	81
9.1	Consequências da fixação.....	81
9.2	Digestão enzimática proteolítica	82
9.3	Recuperação antigénica de origem térmica por alta temperatura	83
10	INIBIÇÃO DE PARTÍCULAS ENDÓGENAS.....	87
10.1	Peroxidase Endógena.....	87
10.2	Fosfatase Alcalina.....	87
10.3	Glucose Oxidase	87
10.4	Pontos susceptíveis de atrair proteínas	87
10.5	Causas de marcação inespecífica ⁵	87
11	IMUNOCITOQUÍMICA.....	89
11.1	Enquadramento histórico	89
11.2	Aplicação da imunocitoquímica.....	90
11.3	Preparação de amostras	91
11.3.1	Esfregaço convencional	91
11.3.2	Processamento em monocamada.....	92
11.3.3	Processamento em bloco de parafina	93
11.4	Fixação em imunocitoquímica.....	93
12	CONTROLO DE QUALIDADE.....	95
12.1	Avaliação da qualidade da imunohistoquímica.....	95
12.1.1	Preservação da morfologia do tecido.....	97
12.1.2	Sensibilidade.....	97
12.1.3	Especificidade.....	97
12.1.4	Contraste	98
12.1.5	Operacionalização do instrumento de recolha de dados	98
12.1.6	Score final	101
13	AUTOMATIZAÇÃO	105
13.1	Ventana Ultra	108
13.2	Leica Bond III	109
14	IMUNOHISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO	111
14.1	Principais antigénios detetados por imunohistoquímica.....	114
14.1.1	Recetores de Estrogénio	114

14.1.2	Recetores de Progesterona	115
14.1.3	Proteína p53	115
14.1.4	ERBB2.....	116
14.1.5	Bcl2	118
14.1.6	CD3	119
14.1.7	CD20.....	119
14.1.8	Citoqueratinas 8/18.....	119
14.1.9	CD30.....	120
14.1.10	CD45	120
14.1.11	Ki67	121
14.1.12	Proteína S100	122
14.1.13	Cadeias leves Kappa e Lambda	122
14.1.14	Vimentina.....	123
14.1.15	Citoqueratina 7	123
14.1.16	Citoqueratinas (clones AE1/AE3)	124
14.1.17	Actina do Músculo Liso	125
15	MARCAÇÃO MÚLTIPLA	126
15.1	Método simultâneo.....	126
15.2	Método sequencial com desnaturação intercalar	127
16	CONCLUSÃO	129
17	APÊNDICES.....	131
17.1	Apêndice 1 - Adesivação de lâminas - APES.....	131
17.2	Apêndice 2 - Tampão EDTA 1 mM pH 8.0.....	131
17.3	Apêndice 3 - Tampão citrato, pH 6.0.....	131
17.4	Apêndice 4 - Tampão Tris/EDTA, pH9.0.....	132
17.5	Apêndice 5 - Solução de pepsina 0,4% pH 1/2	132
17.6	Apêndice 6 - Solução de bloqueio da Peroxidase Endógena	132
17.7	Apêndice 7 - Protocolo de Técnica Imunohistoquímica LSAB.....	132
17.8	Apêndice 8 - Protocolo de Técnica Imunohistoquímica de Polímero Indireto 133	
18	LISTA BIBLIOGRÁFICA	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	- Lâmina de microscópio com amostra histológica	1
Figura 2	- Lâmina de microscópio com amostra citológica processada por <i>thinprep</i> ®	2
Figura 3	- Albert Coons.....	4
Figura 4	- Artigo pioneiro em imunohistoquímica publicado em 1942	4
Figura 5	- FITC conjugado com marcador anti-factor nuclear HEP 2.....	4
Figura 6	- Imunomarcção por HRP associada a anticorpos anti-actina do músculo liso (A) e fosfatase alcalina associada a anticorpos anti-insulina (B)	5
Figura 7	- Autorradiogramas com vitamina D marcada com trítio na amígdala cerebral ...	5
Figura 8	- Epítipo e paratopo	10
Figura 9	- Especificidade do anticorpo.....	11
Figura 10	- Aspecto esquemático de uma imunoglobulina	11
Figura 11	- Quebra da molécula de anticorpo	12

Figura 12 – <i>Hinge</i> do anticorpo.....	12
Figura 13 - Localização das diferentes zonas estruturais do anticorpo.....	13
Figura 14 – Interação entre zonas hipervariáveis e ligações dissulfídicas do anticorpo.	14
Figura 15 – Estrutura esquemática das diferentes imunoglobulinas	16
Figura 16 – Ligação eletroestática (iônica)	17
Figura 17 – Ligação por ponte de hidrogénio.....	17
Figura 18 – Ligações hidrofóbicas	18
Figura 19 – Ligações por forças de van der Waals	18
Figura 20 – Soro policlonal.....	19
Figura 21 – Produção de soros policlonais.....	20
Figura 22 – Soro total.....	21
Figura 23 – Soro de fração de imunoglobulinas	21
Figura 24 – Soro de afinidade isolada.	22
Figura 25 – Soro Monoclonal	22
Figura 26 – Jerne, Kohler e Milstein.....	23
Figura 27 - Produção de soros monoclonais.....	24
Figura 28 - Imunização.....	24
Figura 29 – Fusão de células de mieloma e plasmócitos.....	26
Figura 30 – Frascos contentores	29
Figura 31 – Imunofluorescência	31
Figura 32 – Espectro de radiações.....	31
Figura 33 – Microscópio de Fluorescência	35
Figura 34 - IgG em padrão linear.....	36
Figura 35 - Imunofluorescência positiva para IgA em padrão granular	36
Figura 36 – Microscópio ótico.	37
Figura 37 – Enzimas e Co-fatores.....	38
Figura 38 – Papel catalisador das enzimas numa reação	39
Figura 39 – Reação de oxidação-redução.....	41
Figura 40 – Reação de transferência.....	41
Figura 41 – Reação de hidrólise.....	41
Figura 42 – <i>Horseradish</i>	43
Figura 43 – Estrutura química da HRP.....	43
Figura 44 – Estrutura tridimensional da HRP. O grupo heme está localizado no centro com o átomo de ferro a vermelho e os iões de cálcio são as esferas pretas	44
Figura 45 – Representação esquemática da revelação por DAB.....	45
Figura 46 – Imunomarcação por DAB	45
Figura 47 – Revelação por AEC	46
Figura 48 – Reação de revelação da fosfatase alcalina por NBT-BCIP.....	47
Figura 49 – Revelação por NBT-BCIP	47
Figura 50 – Revelação por <i>New Fuchsin</i>	48
Figura 51 – Revelação por Fast Red TR.	48
Figura 52 – Hematoxilina de Harris	49
Figura 53 – Hematoxilina de Mayer	49
Figura 54 – Nuclear Fast Red.....	50
Figura 55 – Verde Metilo	50
Figura 56 – Método direto	51
Figura 57 – Método indireto simples.....	52
Figura 58 – Método PAP	53
Figura 59 – Método APAAP.....	54

Figura 60 – Representação esquemática da avidina com 4 bolsas	55
Figura 61 – Representação esquemática da avidina ligada a 4 biotinas.....	55
Figura 62 – Estrutura química da Biotina.....	56
Figura 63 – Bloqueio da biotina endógena.....	57
Figura 64 – Método streptABC.....	58
Figura 65 – Método LSAB/LAB	59
Figura 66 – Polímero de esqueleto interno.....	61
Figura 67 - Dextrano (esquerda - estrutura química; centro - aspeto físico; direita - <i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	62
Figura 68 – Polímero de esqueleto interno direto	63
Figura 69 – Polímero de esqueleto interno indireto	63
Figura 70 – Micropolímero de enzimas indireto.....	65
Figura 71 - A colocação do segundo anticorpo permite aumentar a quantidade de polímeros ligados	66
Figura 72 - A colocação do segundo anticorpo permite associar o polímero ao antigénio	66
Figura 73 – Soros pré-diluídos.....	68
Figura 74 – Colocação de ponta na micropipeta	69
Figura 75 – Colocação da micropipeta	70
Figura 76 – Utilização do polegar para pipetar	70
Figura 77 – Micropipeta e tubo ao nível dos olhos.....	71
Figura 78 – Pressão no êmbolo da micropipeta.....	71
Figura 79 – Introdução da ponta no líquido	71
Figura 80 – Libertar o êmbolo da micropipeta.....	72
Figura 81 – Ponta a tocar parede do tubo.....	72
Figura 82 – Pressão no êmbolo da micropipeta.....	72
Figura 83 – Crióstato para corte de material congelado.....	76
Figura 84 – Microtomo para cortes de parafina.....	76
Figura 85 – Ponte de metileno entre aminoácidos.....	77
Figura 86 – Alteração estrutural em proteínas fixadas por formaldeído.....	77
Figura 87 – Processador automático de tecidos.....	79
Figura 88 – Reação entre Ca ²⁺ e EDTA	84
Figura 89 – Lâmina, filtro e embalagem de fixador utilizados para método monocamada.	92
Figura 90 – Amostra de Citologia Ginecológica. Esfregaço convencional (esquerda) e método monocamada (direita). Coloração de Papanicolaou, 100x.....	92
Figura 91 – Histogel.....	93
Figura 92 – Imunomarcação para Citoqueratinas 8/18 em amostra citológica com pós- fixação em Formaldeído (400x).....	94
Figura 93 – Conceptualização da metodologia de recolha de dados.....	96
Figura 94 – Operacionalização da metodologia de recolha de dados	99
Figura 95 – Shandon Sequenza	105
Figura 96 – Shandon Cadenza	106
Figura 97 – Dako Techmate.....	106
Figura 98 – LabVision Autostainer	107
Figura 99 – Ventana Nexes	107
Figura 100 – Ventana Ultra – vista frontal.....	108
Figura 101 – Ventana Ultra – recipiente de recolha de detritos líquidos.....	108
Figura 102 – Ventana Ultra – aspeto do interior.....	109

Figura 103 – Ventana Ultra – reagentes.....	109
Figura 104 – Leica Bond III – vista frontal.....	109
Figura 105 - Leica Bond III - <i>covertiles</i> colocados na superfície das lâminas.	110
Figura 106 - Leica Bond III – aspeto do interior.....	110
Figura 107 - Leica Bond III – reagentes.	110
Figura 108 - Algoritmo utilizado para tumores indiferenciados.....	112
Figura 109 - Algoritmo utilizado para situações linfoproliferativas.....	113
Figura 110 - Recetores de Estrogénio (HRP, 400x).	114
Figura 111 - Recetores de progesterona (HRP, 400x).	115
Figura 112 - Proteína p53 (HRP, 100x).	116
Figura 113 – Algoritmo para avaliação de expressão de ERBB2 por imunohistoquímica.	117
Figura 114 - ERBB2 (HRP, 100x).....	118
Figura 115 - Bcl-2 (HRP, 100x).	118
Figura 116 - CD3 (HRP, 100x).	119
Figura 117 - CD20 (HRP, 400x).....	119
Figura 118 – Citoqueratina 8/18 (HRP, 400x).....	120
Figura 119 - CD30 (HRP, 100x).....	120
Figura 120 - CD45 (HRP, 100x).....	121
Figura 121 – A célula expressa Ki67 ao longo de todo o Ciclo celular, excepto na fase G0	121
Figura 122 - Ki67 (HRP, 100x).	122
Figura 123 – Proteína S100 (HRP, 400x).	122
Figura 124 - CL Kappa (HRP, 100x).....	123
Figura 125 - CL lambda (HRP, 100x).	123
Figura 126 – Vimentina (HRP, 100x).....	123
Figura 127 - Citoqueratina 7 (HRP, 400x).	124
Figura 128 – Citoqueratina (clones AE1/AE3) (HRP, 400x).	125
Figura 129 – Actina do músculo liso (HRP, 100x).	125
Figura 130 - CD3 (negro) e CD20 (castanho) em gânglio linfático (HRP, 100x).....	127
Figura 131 - Glicoforina A (castanho), CD20 (negro) e CD3 (vermelho) em baço (100x).	127
Figura 132 - Insulina (castanho), Citoqueratina (negro) e CD34 (vermelho) em pâncreas (400x).....	128
Figura 133 – CD20 (castanho), Citoqueratina (negro) e AML (vermelho) em ap. ileo-cecal (400x).....	128

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores em imunohistoquímica.....	5
Tabela 2 – Métodos imunohistoquímicos	6
Tabela 3 – Aplicações da imunohistoquímica	6
Tabela 4 – Condições que sustentam a qualidade da imunohistoquímica.....	7
Tabela 5 – Vantagens e desvantagens de soros policlonais e monoclonais	28
Tabela 6 – Características de fluorocromos.....	33
Tabela 7 – Características dos Fluorocromos	34
Tabela 8 – Principais causas de resultados falsos em imunocitoquímica.....	91
Tabela 9 – Características das metodologias de preparação de amostras citológicas.....	91

Tabela 10 - Classificação da preservação da morfologia	99
Tabela 11 - Classificação da intensidade de imunomarcção	100
Tabela 12 - Classificação da imunomarcção específica	100
Tabela 13 - Classificação da imunomarcção inespecífica	101
Tabela 14 - Classificação da intensidade de coloração de contraste	101
Tabela 15 - Grelha de avaliação de qualidade da imunohistoquímica.....	102
Tabela 16 - Fatores de ponderação do score final da qualidade da imunohistoquímica	103

1 IMUNOHISTOQUÍMICA

1.1 Imunohistoquímica e Imunocitoquímica

Desde o seu surgimento que as técnicas que utilizam a reação anticorpo-antígeno para a detecção e caracterização de moléculas no seu local de origem têm sido denominadas de Imunohistoquímica e/ou Imunocitoquímica. Ao longo do tempo esta terminologia tem sido utilizada de forma frequente para identificar as mesmas metodologias de forma, por vezes, indiscriminada. Numa tentativa de evitar as incorreções e diminuir as associações erróneas de palavras-chave em livros e artigos, que podem provocar uma pulverização ou a omissão da bibliografia relevante existente, alguns autores têm tentado clarificar a nomenclatura utilizada, principalmente com base na natureza da amostra biológica que é analisada¹.

O termo Imunohistoquímica é associado a metodologias que usam imuno-ensaios para co-localizar um epítipo de interesse em cortes de tecido. Também se englobam os métodos que recorrem a blocos de células ou de coágulos preparados a partir de materiais citológicos e hematológicos. Na maioria dos casos, o tecido é removido do ser vivo e conservado/fixado por congelação ou por métodos químicos (e.g. formaldeído) e embebido em parafina. Posteriormente são obtidas secções muito finas, de cerca de 4µm, a partir do material congelado ou incluído em parafina e colocadas em lâminas de vidro. Desta forma, é possível co-localizar os antígenos nos componentes histológicos e celulares, mantendo a arquitetura original do tecido circundante. Dependendo do método de fixação, as amostras de tecidos e/ou células podem ser sujeitas a estratégias de recuperação antigénica (Figura 1).²



Figura 1 – Lâmina de microscópio com amostra histológica

Fonte: http://science.taskermilward.org.uk/mod1/Year%207/Mod2/Mod2_img/onionslide%20002.jpg

O termo Imunocitoquímica é associado a metodologias que usam imuno-ensaios para co-localizar um epítipo de interesse em esfregaços citológicos, preparações citocentrifugadas (e.g. *cytospin*®) ou preparações monocamada (e.g. *thinprep*®). Como o processamento destas amostras citológicas é, com frequência, substancialmente diferente do processamento em imunohistoquímica, os testes imunocitoquímicos requerem diferentes medidas de controlo de qualidade, com ênfase na utilização de controlos positivos e negativos apropriados. A maioria da matriz extracelular e outros componentes do estroma não estão presentes, deixando apenas as células inteiras e isoladas ou em pequenos agregados, pelo que é frequentemente aplicado um procedimento de permeabilização, para que os anticorpos possam atingir alvos intracelulares (Figura 2).



Figura 2 – Lâmina de microscópio com amostra citológica processada por *thinprep*®

Fonte: <http://www.hologic.de/uploads/images/imagerslide.large.jpg>

Por uma questão de simplificação, ao longo deste documento será utilizado o termo Imunohistoquímica pois as metodologias descritas, apesar de também serem utilizadas em imunocitoquímica, estão mais frequentemente associadas a tecidos fixados em formaldeído e incluídos em parafina.

1.2 Definição geral

A imunohistoquímica é o conjunto de metodologias em que se utilizam anticorpos como reagentes específicos capazes de identificar e estabelecer ligação com constituintes tecidulares que funcionam como antigénios. Esta ligação permite situar e identificar a presença de variadas substâncias nas células e tecidos por intermédio da cor que é associada aos complexos antigénio-anticorpo entretanto formados³.

O valor prático desta área tecnológica, muito utilizada em diagnóstico em Anatomia Patológica e investigação, resulta da possibilidade de combinar um marcador com um anticorpo, sem provocar qualquer tipo de dano à ligação específica estabe-

lecida entre anticorpo e antigénio. Este facto propicia a observação microscópica dos locais onde se encontra o anticorpo e, conseqüentemente, o antigénio⁴.

Pode-se dizer que a Imunohistoquímica se apresenta como um poderoso meio de identificação *in situ* de várias estruturas celulares e tecidulares que podem estar diretamente associadas a patologias, bem como das conseqüências, a nível funcional e morfológico, da ação desses mesmos elementos⁵.

Na última vintena de anos a crescente valorização de diagnósticos diferenciais em Anatomia Patológica tem implicado um desenvolvimento progressivo da imunohistoquímica, levando a um progresso das metodologias para demonstração de antigénios em tecido fixado em formaldeído e incluído em parafina, o que tem contribuído significativamente para o diagnóstico de muitas patologias e, inclusive, o prognóstico e a indicação terapêutica⁶.

De acordo com Werner⁷:

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

Não obstante, persistem algumas dificuldades, eco das particularidades de determinadas patologias e limitações técnicas, pelo que a padronização da imunohistoquímica tem sido uma tarefa dura de completar. A qualidade da marcação depende de três principais fatores além da qualidade dos anticorpos^{8,9}:

- A. Fase pré-analítica (destacando-se fixação do tecido e processamento);
- B. Recuperação antigénica de epítomos;
- C. Sensibilidade do sistema de deteção.

1.3 Enquadramento histórico

A primeira experiência de relevância no campo da imunohistoquímica foi introduzida por Coons, Creech e Jones¹⁰ em 1941 (Figura 3), e consistiu na conjugação de um anticorpo com um corante fluorescente.



Figura 3 – Albert Coons

Fonte: <http://www.nap.edu/readingroom.php?book=biomems&page=acoons.html>

Em 1942 foi publicada a descrição da utilização do referido anticorpo para identificação de antígenos em cortes histológicos, o que significou a entrada numa nova dimensão no diagnóstico em Anatomia Patológica¹¹.

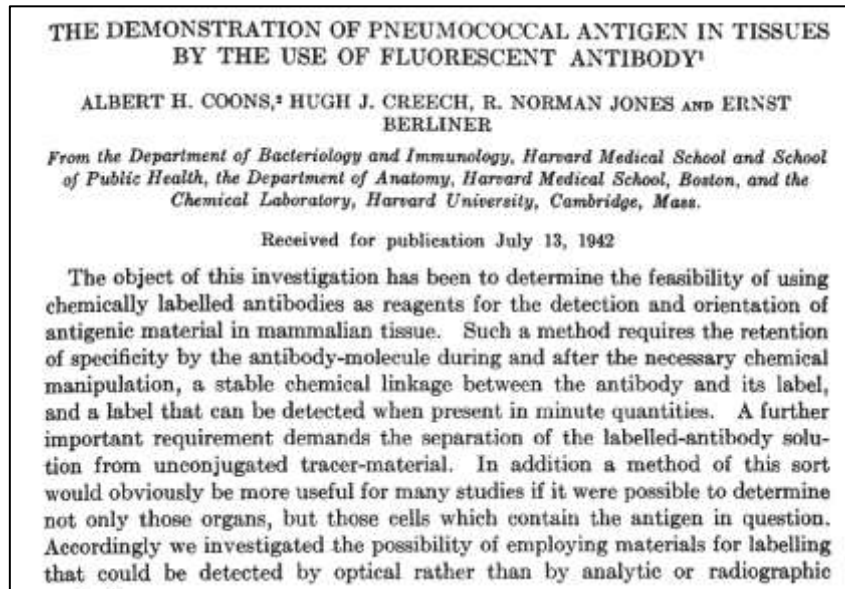


Figura 4 – Artigo pioneiro em imunohistoquímica publicado em 1942

Fonte: <http://www.jimmunol.org/content/45/3/159.full.pdf+html>

O 1º composto a ser conjugado com um anticorpo foi o isocianato de fluoresceína¹⁰ e mais tarde surgiu o isotiocianato de fluoresceína (FITC), mais fácil de conjugar. O FITC tem excitação e emissão ao nível dos comprimentos de onda de aproximadamente 495nm a 521nm e, como a maioria dos fluorocromos, é propenso a fotodegradação⁵ (Figura 5).

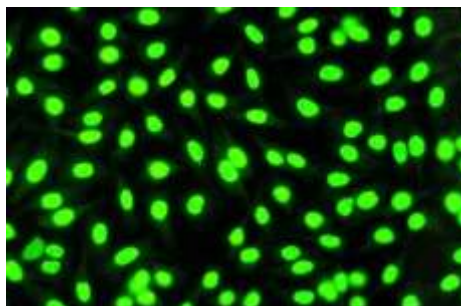


Figura 5 – FITC conjugado com marcador anti-factor nuclear HEP 2

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

Gradualmente, passaram a utilizar-se novos compostos marcadores como as enzimas *horseradish peroxidase* (HRP) em 1966¹² e fosfatase alcalina em 1978¹³ (Figura 6).

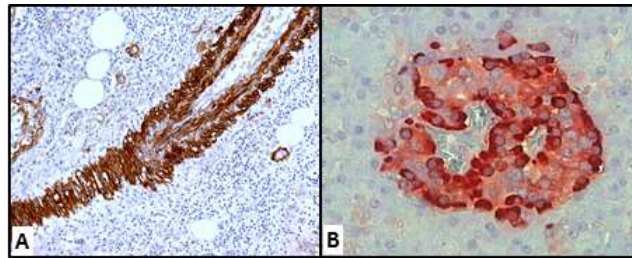


Figura 6 – Imunomarcção por HRP associada a anticorpos anti-actina do músculo liso (A) e fosfatase alcalina associada a anticorpos anti-insulina (B)

Também se tornou possível a marcação de anticorpos com substâncias radioativas¹⁴, visualizando-se o resultado por autoradiografia - Figura 7.

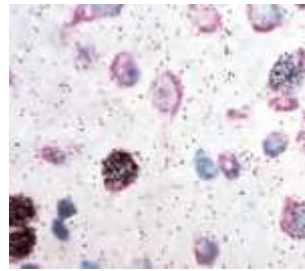


Figura 7 – Autoradiogramas com vitamina D marcada com trítio na amígdala cerebral

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

O produto final das reações enzimáticas pode adquirir eletrodensidade ou seja densidade para os elétrons, mas existem outros produtos que intrinsecamente já possuem esta capacidade, podendo ser utilizados em imunohistoquímica para microscopia eletrônica: ferritina desde 1961¹⁵ e ouro coloidal desde 1971¹⁶ (Tabela 1).

Tabela 1 – Marcadores em imunohistoquímica

Grupo	Nome
Compostos fluorescentes	Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)
	Isotiocianato de Rodamina
Enzimas	Peroxidase (HRP)
	Fosfatase alcalina

Metais pesados	Ferritina
	Ouro coloidal
Compostos Radioativos	¹⁴ C
	³⁵ S

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

Tabela 2 - Métodos imunohistoquímicos

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

1.4 Principais aplicações

A imunohistoquímica tem as suas principais aplicações no estudo de neoplasias, doenças infecciosas e doenças degenerativas, podendo, no entanto, ser aplicada no estudo de muitas outras patologias. Permite também o estabelecimento de prognósticos e a indicação terapêutica (Tabela 3).

É uma disciplina em permanente evolução, devendo todos os investigadores que se dedicam a esta atividade permanecer em constante procura, no sentido de estabelecer novos protocolos, adaptando às suas necessidades toda a gama de reagentes disponível no mercado⁵.

Tabela 3 - Aplicações da imunohistoquímica

Neoplasias	Diagnóstico	Diagnóstico de neoplasias de baixa diferenciação morfológica
		Caracterização da histogénese e patogénese
		Distinção do carácter maligno ou benigno de proliferações celulares
		Caracterização da origem de metástases indiferenciadas
	Prognóstico	Identificação da presença de recetores hormonais
		Caracterização da expressão de proto-oncogenes
		Estudo de proteínas supressoras de tumor
		Caracterização da presença de indicadores de proliferação celular

	Indicação terapêutica	Quantificação da expressão de Her2/neu em neoplasia mamária
		Identificação da presença de CD117 em tumores do estroma gástrico
Doenças infecciosas	Caracterização dos agentes etiológicos (bactérias, vírus e protozoários)	
	Fenotipagem da reação inflamatória envolvente	
Outras patologias	Caracterização de subtipos de amiloidose	
	Caracterização de produtos de secreção de células	Hormonas
		Enzimas

1.5 Conceptualização da Imunohistoquímica

Tal como qualquer outro tipo de tecnologia, a imunohistoquímica é baseada em determinados requisitos de modo a que possa ser realizada de uma forma válida, correta e eficaz⁵.

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

A segunda condição é a marcação específica pelo anticorpo primário, isto é, o anticorpo deverá apenas ligar-se ao antigénio pretendido (marcação específica) e não a outros elementos estranhos (marcação inespecífica). O que se pretende obter é uma marcação específica do antigénio com ausência de marcação inespecífica de fundo⁵.

Depois temos a terceira condição: é fundamental conhecer os atributos dos tipos de soros a aplicar: clonalidade, classe/subclasse da imunoglobulina, especificidade, reatividade e condições de manuseamento, revelam-se essenciais para a interpretação de resultados, bem como para a avaliação da qualidade da técnica⁵.

Finalmente surge a quarta e última condição: para uma escrupulosa realização destas técnicas é imprescindível o uso de uma marcação estável com uma intensidade suficiente, que não suscite qualquer tipo de dúvidas relativamente à presença ou ausência do antigénio no tecido⁵ (Tabela 4).

Tabela 4 – Condições que sustentam a qualidade da imunohistoquímica

CONDIÇÃO	CARACTERÍSTICAS
Antigénio disponível	O antigénio deverá permanecer no seu local original, insolúvel e disponível
	O antigénio deve ser reconhecível pelo anticorpo (com ou sem métodos de recuperação)
Marcação específica	O anticorpo deverá ligar-se ao antigénio pretendido
Anticorpo caracterizado	Deverão ser conhecidos todos os elementos teciduais a que o anticorpo se pode ligar

	Deverá ser conhecida toda a sequência de ligação anticorpo-antígeno
	As características do anticorpo devem ser conhecidas (e.g. classe, subclasse, produção)
Marcador visualizável	Marcadores Enzimáticos, Fluorescentes, metálicos ou radioativos

2 ANTIGÊNIO E ANTICORPO

2.1 Antígeno

Um antígeno é geralmente uma molécula com razoável dimensão, como uma proteína, um lípido, um hidrato de carbono ou um ácido nucleico, que uma vez introduzido num organismo induz uma resposta por parte do sistema imunitário, com produção de anticorpos específicos. Tal deve-se ao facto de cada antígeno ser constituído por diversos radicais químicos, com capacidade de promover a produção de anticorpos ou imunoglobulinas¹⁷.

Os antígenos são reconhecidos principalmente devido à sua estrutura tridimensional, resultante da sua nuvem de eletrões, sendo este facto consistente com a natureza das afinidades antígeno-anticorpo⁵. Cada uma destas moléculas apresenta na sua superfície, um ou mais locais específicos de ligação ao anticorpo – determinante antigénico ou epítopo. Estas regiões de ligação altamente específicas são constituídas por sequências (completas ou fragmentos) de proteínas ou de polissacarídeos¹⁷.

Tendo em conta que, segundo a sua estrutura, os antígenos apresentam a capacidade de estabelecer ligações com um dado anticorpo, todas as moléculas podem constituir potenciais antígenos¹⁷. Quando essas moléculas evidenciam um peso molecular superior a 8 kDa, possuem a capacidade de atuar por si só como antígenos. Por sua vez, substâncias de baixo peso molecular podem ligar-se a moléculas com um peso molecular superior, os chamados haptenos, e desempenhar as funções de antígeno^{17,18}.

2.2 Imunogénio

Um imunogénio é um antígeno, sintético ou natural, utilizado para produzir anticorpos em massa. A fonte e preparação de um imunogénio são muito importantes para se obter a melhor qualidade de reagentes para técnicas imunohistoquímicas. Existem dois grandes grupos de imunogénios: péptidos sintéticos e proteínas purificadas. Os péptidos sintéticos têm a vantagem de possuir uma sequência de aminoácidos conhecida, contudo, pode não ser possível alcançar laboratorialmente a conformação tridimensional da proteína nativa, o que pode originar falsos negati-

vos se a aplicação do anticorpo criado a partir deste imunogénio não for devidamente caracterizada. Pode ainda ser impossível recriar determinado antigénio *in vitro* visto que as modificações pós-traducionais representam muitas vezes um importante processo para a conformação final de um antigénio *in vivo*. O uso de antigénios purificados evita muitos destes problemas, mas origina outros. O processo de purificação é muitas vezes difícil de otimizar, podendo o produto final conter demasiadas proteínas contaminantes. Um outro problema ao utilizar antigénios purificados, prende-se com a presença de outros epítomos que não são específicos para a obtenção do anticorpo pretendido⁹.

2.3 Anticorpo

Os anticorpos são as moléculas de natureza proteica que são produzidas maioritariamente pelos plasmócitos em resposta à presença de material reconhecido como estranho. A sua principal característica é combinar-se com o material indutor (antigénio) em condições fisiológicas favoráveis à sua ligação. O local de ligação ao epítomo é denominado paratopo. Esta ligação constitui a base da Imunohistoquímica³ (Figura 8).

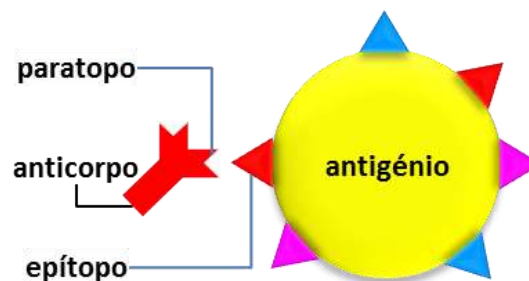


Figura 8 - Epítomo e paratopo

2.3.1 Especificidade e afinidade de um anticorpo

A especificidade é a característica de um anticorpo que lhe permite reconhecer e estabelecer ligações com antigénios individualizados e específicos¹⁷ (Figura 9).

Depende da proximidade e da complementaridade entre antigénio e anticorpo. A alta complementaridade vai estar relacionada com a proximidade entre grupos específicos que estabelecem ligações muito fortes entre si, por perfeita correspondência⁵.

A afinidade é a característica que define a força de ligação entre um antigénio e um anticorpo. Se existirem muitas complementaridades entre estes elementos ao nível

estrutural e químico surgirá uma elevada força de ligação e conseqüentemente uma alta afinidade. Por outro lado se existirem poucas complementaridades iremos ter baixa força de ligação e baixa afinidade¹⁹.

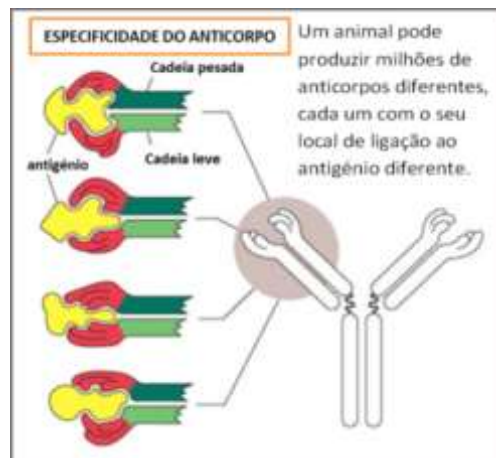


Figura 9 - Especificidade do anticorpo

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

2.4 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são a classe de proteínas que possuem atividade de anticorpo. As imunoglobulinas podem ser visualizadas ao microscópio eletrônico e demonstram uma conformação em Y, que é tomada como exemplo quando se quer representar um anticorpo^{5,20} (Figura 10).

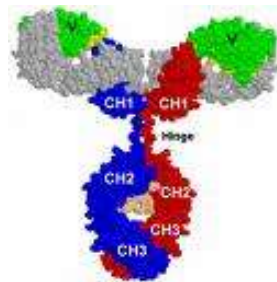


Figura 10 - Aspecto esquemático de uma imunoglobulina

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

Cada imunoglobulina possui uma estrutura básica constituída por quatro cadeias proteicas: duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas, unidas por ligações dissulfídicas que mantêm a estabilidade do anticorpo¹⁷.

A enzima papaína divide a molécula em dois fragmentos com capacidade de ligação ao antígeno - Fab (*fragment antigen binding*) - e um fragmento sem capacidade de ligação ao antígeno - Fc (*fragment crystallisable*). A molécula também pode ser

quebrada pela enzima pepsina dando origem a um fragmento específico: F(ab')₂, com capacidade de ligação ao antígeno e cristalização. A maioria dos anticorpos utilizados em imunohistoquímica é tratada desta forma para evitar reatividade cruzada com a porção pFc' que é reconhecida por alguns recetores de células humanas, podendo originar falsos positivos⁵. Por redução e acidificação pode-se dividir uma imunoglobulina nos seus constituintes básicos: cadeias pesadas e leves (Figura 11).

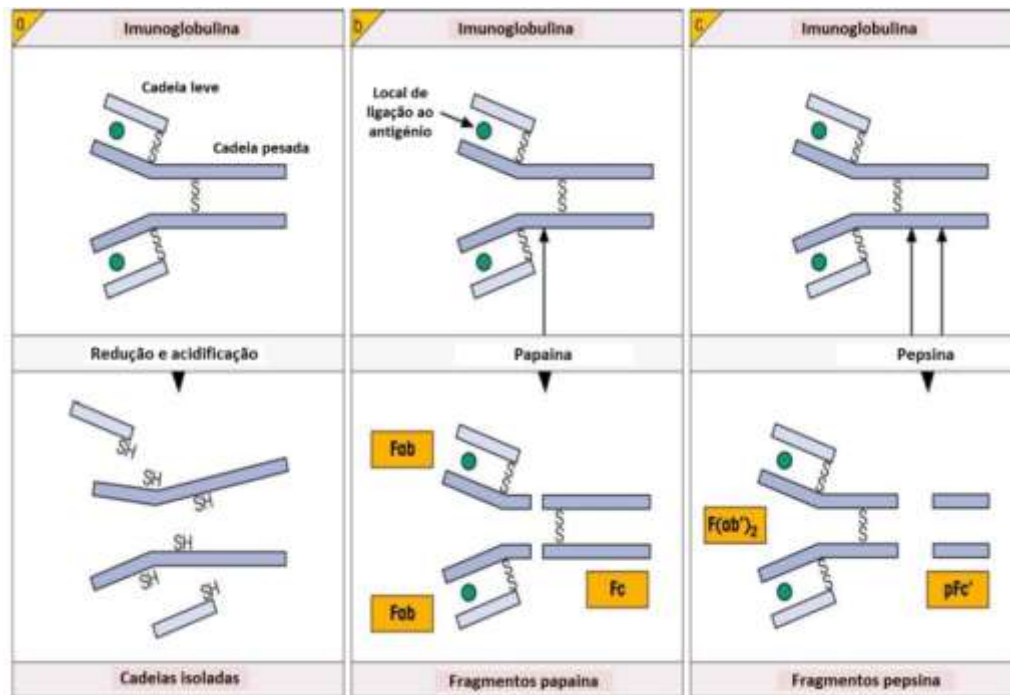


Figura 11 - Quebra da molécula de anticorpo

Fonte: Delves PJ, Roitt IM, eds. Roitt's Essential Immunology. 12th ed. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2011.¹⁷

As imunoglobulinas possuem uma zona móvel denominada *hinge* (dobradiça), que permite ao anticorpo uma mudança de ângulo de orientação de modo a existir uma maior capacidade de ligação ao antígeno²⁰ (Figura 12).

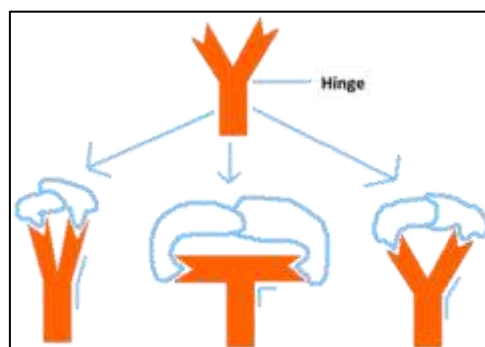


Figura 12 - Hinge do anticorpo

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

Nas cadeias leves e pesadas existem 3 tipos de zonas (Figura 13):

- A. Zonas constantes;
- B. Zonas variáveis;
- C. Zonas hipervariáveis.

A zona constante da cadeia pesada determina o tipo de cadeia pesada em questão e consequentemente o tipo de imunoglobulina. A zona constante da cadeia leve determina o tipo de cadeia leve em questão. As zonas variáveis são as zonas de ligação do anticorpo e as zonas hipervariáveis estão localizadas dentro destas, sendo responsáveis pela ligação altamente específica a um antígeno¹⁷.

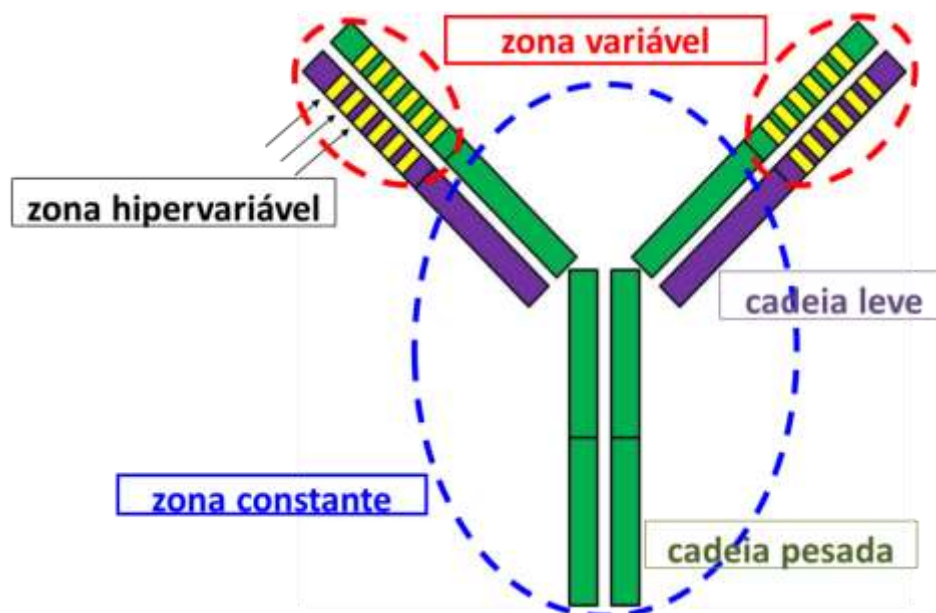


Figura 13 - Localização das diferentes zonas estruturais do anticorpo

A distribuição das zonas hipervariáveis ocorre tipicamente entre os aminoácidos 31-37, 86-91 e 101-110 na cadeia pesada e entre os aminoácidos 23-34, 50-56 e 89-97 na cadeia leve. Enquanto as ligações dissulfídicas se estabelecem entre os aminoácidos 22-98 na cadeia pesada e 23-98 na cadeia leve. Isto vai permitir a organização espacial da molécula de anticorpo de modo a expor ativamente as áreas específicas de ligação ao contacto com o antígeno⁵ (Figura 14).

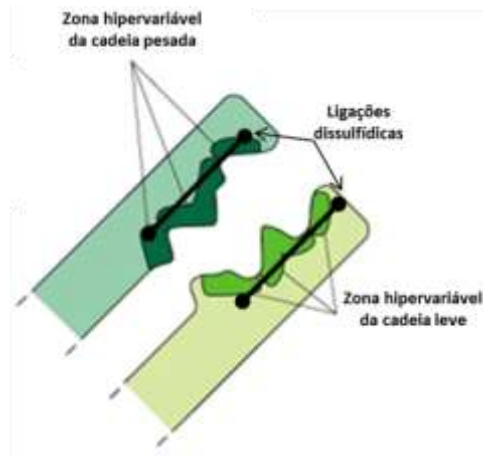


Figura 14 – Interação entre zonas hipervariáveis e ligações dissulfídicas do anticorpo

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

2.5 Cadeias leves

Existem cadeias leves kappa e lambda, no entanto, cada anticorpo possui cadeias leves de um só destes tipos¹⁷. A distribuição de cadeias leves difere em todas as classes e subclasses de imunoglobulinas, bem como entre diferentes espécies animais. No ser humano, as cadeias kappa constituem cerca de 65% do total de cadeias leves²⁰.

2.6 Cadeias pesadas

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

2.6.1 Cadeia pesada Alfa

A cadeia pesada Alfa está presente na imunoglobulina de tipo A (IgA). Existe nas secreções sero-mucosas – saliva, lágrimas, suor, corrimento nasal ou secreções gastrointestinais, onde possui funções de defesa contra o ataque por microorganismos. Existe nestes líquidos sob a forma de dímero estabilizado contra a proteólise por combinação com outra proteína (o componente secretor), sintetizado por células epiteliais e que possui uma cadeia peptídica simples. A dimerização é efetuada por conjugação com uma outra cadeia proteica (cadeia J)⁵ (Figura 15). Tem como função principal ligar-se aos microorganismos, diminuindo a sua capacidade

de aderência às células epiteliais, impedindo assim a sua entrada. Possui duas subclasses com diferentes ligações dissulfídicas: IgA₁, IgA₂¹⁸.

2.6.2 Cadeia pesada Delta

A cadeia pesada Delta pode ser encontrada na imunoglobulina de tipo D (IgD) que foi a última a ser descoberta. Possui menor capacidade de resistência à digestão proteolítica, ao contrário das outras imunoglobulinas, o que explica o seu curto tempo de vida no plasma sanguíneo. Possui uma elevada percentagem de glúcidos e encontra-se na superfície de linfócitos sanguíneos com a função de ativador/inibidor¹⁷ (Figura 15).

2.6.3 Cadeia pesada Epsilon

A cadeia pesada Épsilon está presente na imunoglobulina de tipo E (IgE), existindo em baixa proporção no organismo humano. Forma uma segunda barreira de defesa contra o ataque de microorganismos nas superfícies externas do organismo. Está presente em afeções por parasitas e é responsável por alguns dos sintomas de alergia atópica - reação inflamatória¹⁸ (Figura 15).

2.6.4 Cadeia pesada Gama

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

Existem 4 subclasses – IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ – possuindo, cada uma delas, cadeias pesadas ligeiramente diferentes, na constituição por aminoácidos e nas ligações dissulfídicas (Figura 15). Caracterizam-se por possuir diferentes concentrações serológicas ao longo da vida do ser humano¹⁷.

2.6.5 Cadeia pesada Miu

A cadeia pesada Miu encontra-se na imunoglobulina de tipo M (IgM). As moléculas de IgM são polímeros de 5 unidades de anticorpos, unidos por uma cadeia J (Figura 15). Existe principalmente na corrente sanguínea e possui principal apetência para

antígenos com vários epítomos. Tem alta capacidade citolítica e resposta rápida, estando envolvida nos casos de resposta a bacteremia¹⁷.

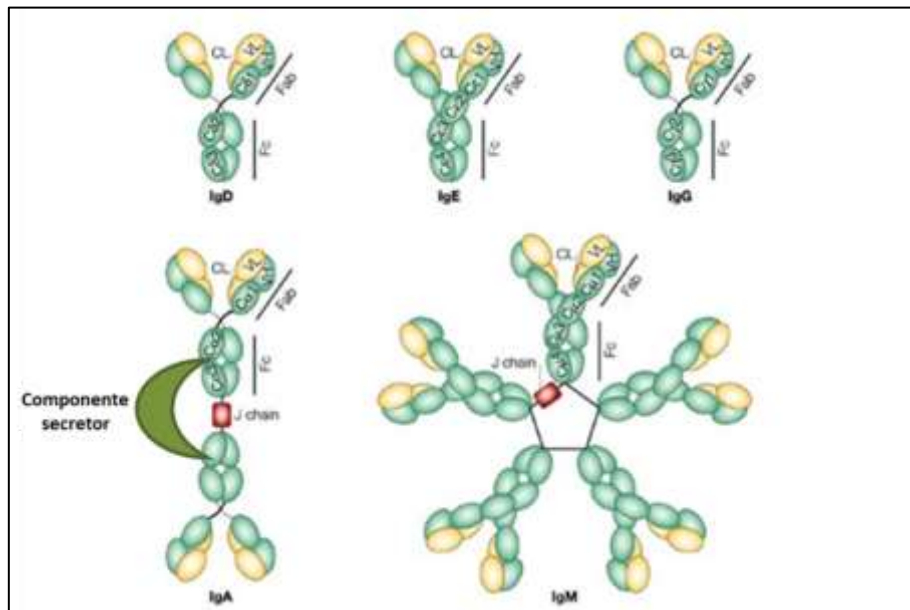


Figura 15 – Estrutura esquemática das diferentes imunoglobulinas

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

2.7 Forças de ligação entre antígeno e anticorpo

Todas as forças de atração entre antígeno e anticorpo possuem em comum a necessidade de proximidade entre moléculas para se criarem, podendo ser de quatro tipos: eletrostáticas, pontes de hidrogênio, hidrofóbicas e forças de van der Waals^{5,19}. Individualmente, estes tipos de forças não são muito robustos, mas, quando combinados, conseguem estabelecer ligações bastante fortes. A contribuição de cada um destes tipos de força depende do tipo e da localização dos aminoácidos que se encontram no antígeno e no anticorpo¹⁹.

2.7.1 Ligação eletrostática ou iônica

A ligação iônica é um tipo de ligação química baseada na atração eletrostática entre dois íons carregados com cargas opostas. Na formação da ligação iônica, um átomo doa um elétron, devido à sua baixa eletronegatividade, formando um íon positivo ou cátion. O elemento receptor adquire então carga negativa tornando-se um ânion. Estes dois elementos podem então estabelecer entre si uma ligação eletrostática ou iônica²¹ (Figura 16).

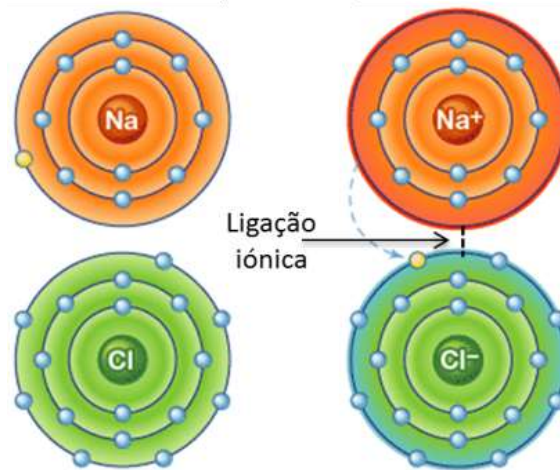


Figura 16 - Ligação eletrostática (iónica)

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

2.7.2 Pontes de hidrogénio

As pontes de hidrogénio são relativamente fracas e reversíveis e formam-se entre grupos hidrofílicos como OH e NH₂ e COOH, dependendo da proximidade das duas moléculas que transportam estes grupos. São fortemente condicionadas pela elevada eletronegatividade dos elementos envolvidos, que aglomeram junto a si a nuvem eletrónica da molécula a que pertencem e criam polos de cargas contrárias que podem atrair moléculas adjacentes no mesmo estado²¹ (Figura 17).

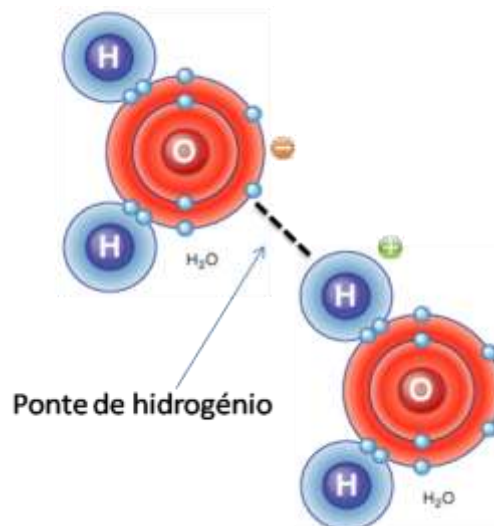


Figura 17 - Ligação por ponte de hidrogénio

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

2.7.3 Ligações hidrofóbicas

Da mesma forma que as gotas de óleo na água podem juntar-se todas numa só, grupos hidrofóbicos não polares tendem a fazer o mesmo. Se dois grupos hidrofóbicos de 2 proteínas se aproximarem o suficiente, de forma a excluírem todas as moléculas de água entre elas, a superfície em contacto com a água é reduzida e as proteínas adquirem um estado de energia mais baixo (menor entropia) do que aquele que existia enquanto estavam separadas, ou seja, surge uma atração entre elas. Estima-se que as forças hidrofóbicas contribuem em mais de 50% da força total da ligação antigénio-anticorpo⁵ (Figura 18).

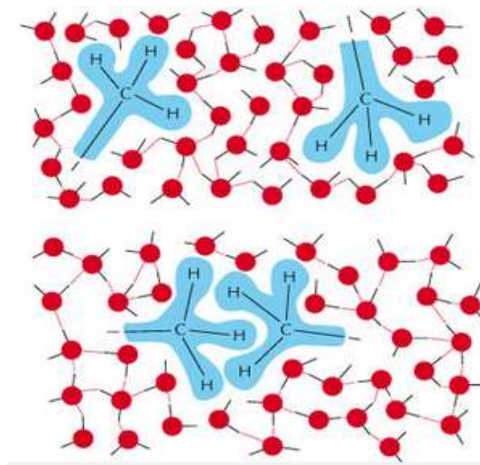


Figura 18 - Ligações hidrofóbicas

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

2.7.4 Forças de van der Waals

As forças de van der Waals estão ligadas a perturbações temporárias da nuvem de eletrões de uma molécula, que podem formar um dipolo elétrico que induz uma perturbação dipolar em outra molécula adjacente, podendo assim os dois dipolos estabelecer uma força de atracção entre eles²¹ (Figura 19).

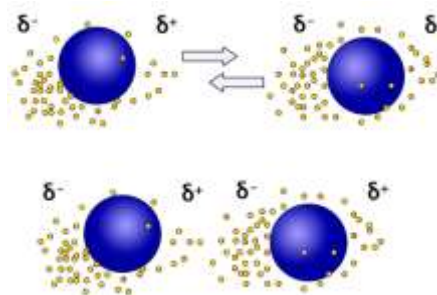


Figura 19 - Ligações por forças de van der Waals

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

3 SOROS POLICLONAIS E MONOCLONAIS

Para realização das técnicas imunohistoquímicas é fundamental possuir reagentes adequados, dos quais se destaca o soro de anticorpos. Este produto é obtido após imunização de animais-alvo, dos quais são posteriormente obtidos, por via direta ou indireta, os anticorpos produzidos²². Existem assim dois tipos de soros de anticorpos, que se distinguem pela forma de produção: soros policlonais e soros monoclonais.

3.1 Soros Policlonais

Os soros policlonais possuem anticorpos produzidos por vários plasmócitos, reagindo assim com diversos epítomos de um antígeno (Figura 20). O animal mais utilizado para a produção de soros policlonais é o coelho, mas podem ser utilizados outros animais (e.g. cabra, porco ou ovelha) cujo sistema imunitário está bem documentado²³.



Figura 20 – Soro policlonal.

3.1.1 Etapas da produção de Soros Policlonais

A sequência habitual de produção inicia-se na escolha do antígeno com a sua injeção no animal-alvo de forma a obter-se uma resposta imunitária e termina na obtenção de um soro purificado com vários anticorpos diferentes dirigidos para os vários epítomos do antígeno⁵ (Figura 21).

A qualidade do soro policlonal é fortemente condicionada pela eficiência das técnicas de purificação, logo este passo é crucial na obtenção de reagentes de qualidade

superior. O uso de animais de laboratório pouco expostos a ambientes abertos e altamente contaminados por antígeno facilita a obtenção de soros com poucos anticorpos previamente desenvolvidos contra outros antígenos¹⁸.

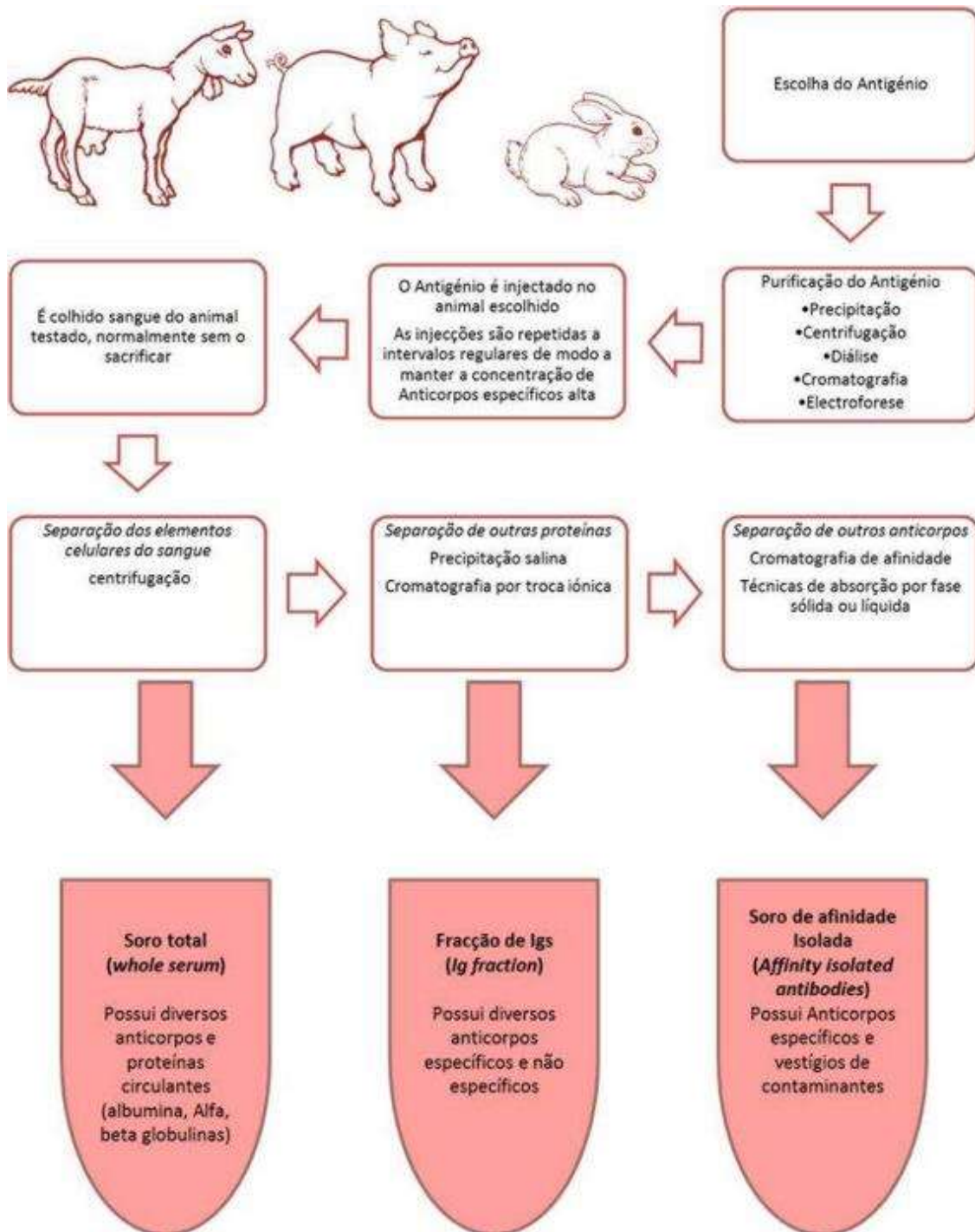


Figura 21 - Produção de soros policlonais

3.1.2 Três tipos de soros policlonais

Existem três tipos de soros policlonais diferenciados pela etapa de seleção e purificação em que se encontram: soro total ou *whole serum*, soro de fração de imunoglobulinas ou *Ig fraction* e soro de afinidade isolada ou *affinity isolated antibodies*¹⁸.

3.1.2.1 Soro Total

O soro total é obtido após extração dos elementos celulares por centrifugação. Possui diversos anticorpos e proteínas circulantes (e.g. albumina, Alfa globulina). Se não se conseguir um soro mais purificado este é utilizado, apesar de não ser o ideal (Figura 22).

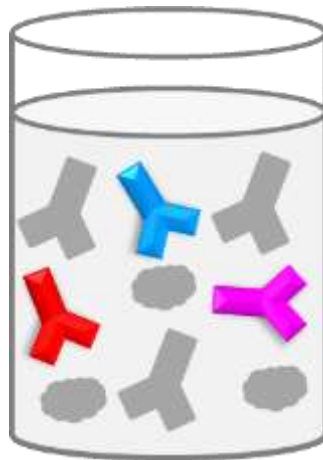


Figura 22 - Soro total.

3.1.2.2 Soro de fração de imunoglobulinas

O soro de fração de imunoglobulinas é obtido após extração das proteínas (exceto imunoglobulinas). Possui diversos anticorpos específicos e não específicos (Figura 23).

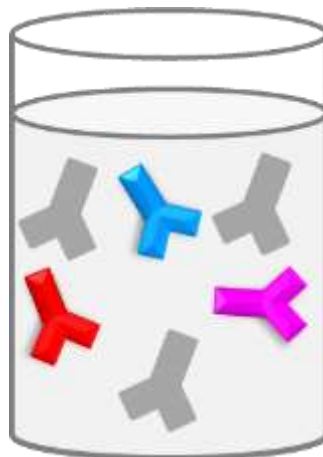


Figura 23 - Soro de fração de imunoglobulinas.

3.1.2.3 Soro de afinidade isolada

O soro de afinidade isolada é obtido após extração das imunoglobulinas não específicas para o antígeno pretendido. Possui somente os anticorpos específicos para o antígeno alvo. Nem sempre se consegue este tipo de soros mas, como é muito mais puro que os outros, tem a possibilidade de oferecer uma melhor marcação. Excepcionalmente, apesar de aplicadas as melhores técnicas de purificação conhecidas, como é um reagente natural e biológico pode possuir vestígios de contaminantes como proteínas e outras imunoglobulinas (Figura 24).

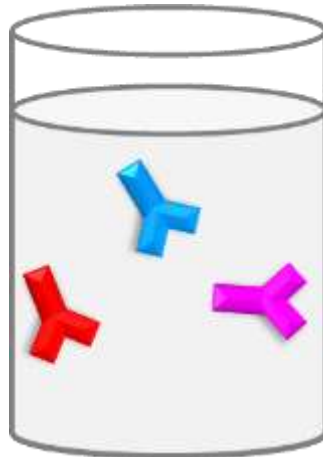


Figura 24 – Soro de afinidade isolada.

3.2 Soros Monoclonais

Um soro monoclonal é um reagente que é o produto de um único clone de plasmócitos imortalizados e que, como tal, é uniforme em estrutura, especificidade e afinidade, podendo ser produzido por tempo indeterminado.

Os anticorpos de um determinado clone são imunoquimicamente idênticos e reagem com um determinado epítopo de um antígeno, contra o qual foram produzidos (Figura 25). O animal mais utilizado para obter clones de anticorpos é o rato^{5,18}.



Figura 25 – Soro Monoclonal

Estes reagentes, introduzidos em 1975²⁴, revolucionaram muitas áreas de trabalho experimental, industrial e clínico, tendo, em 1984, proporcionado o prémio Nobel da medicina e fisiologia aos seus maiores impulsionadores: Jerne, Kohler e Milstein²⁵ (Figura 26).



Figura 26 – Jerne, Kohler e Milstein.

Fonte: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/jerne.jpg

A técnica original de produção sofreu ao longo do tempo algumas melhorias^{24,26}, das quais se destaca a introdução de células modificadas por vírus Epstein-Barr (EBV) por Steinitz *et al* em 1977²⁷ e as técnicas de “repertoire cloning” e ‘Fab/phage display’^{28,29}.

3.2.1 Produção de Soros Monoclonais

A técnica mais utilizada para a produção de soros monoclonais consiste, resumidamente, nos seguintes passos^{5,17} (Figura 27):

- A. Imunização de um animal de modo a serem produzidos anticorpos para um determinado Antígeno que é introduzido por injeções repetidas;
- B. Colheita de plasmócitos no baço desse animal;
- C. Fusão desses plasmócitos (curto tempo de vida) com células de mieloma (longo tempo de vida);
- D. Colocação individual das células resultantes da fusão em cultura de modo a poder recolher-se os anticorpos por elas produzidos;
- E. Testes para os anticorpos em causa, no sentido de se saber quais as suas características;
- F. Manutenção das culturas (clones) que demonstrem características úteis e destruição das restantes;

- G. Recolha sistemática dos anticorpos produzidos pelo clone que passam a constituir o soro monoclonal e que podem ser utilizados em imunohistoquímica.

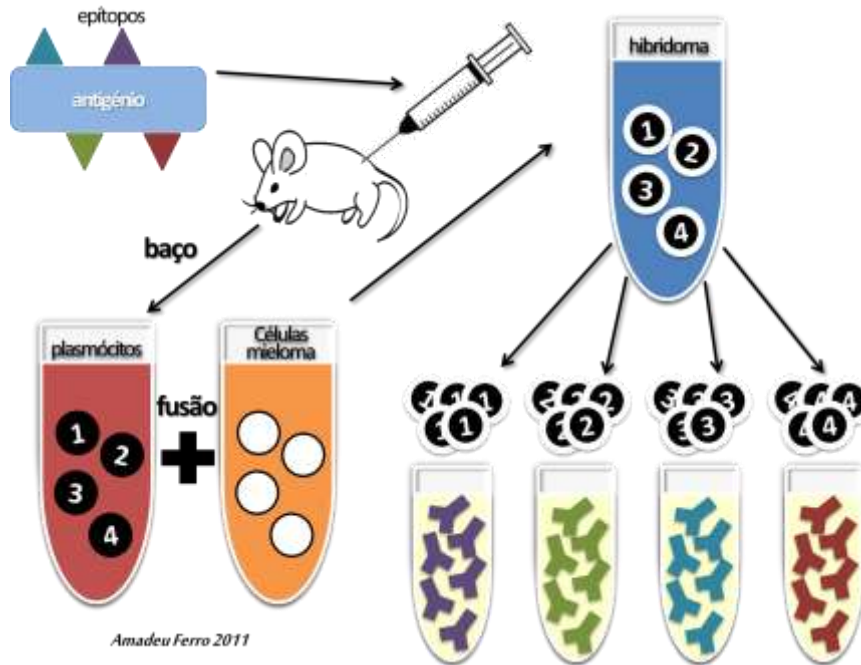


Figura 27 - Produção de soros monoclonais

3.2.1.1 Imunização

Imunização é o nome dado ao processo pelo qual se obtém uma resposta imunológica, por parte de um ser vivo, para um determinado antígeno¹⁷. Essa resposta pode implicar a produção pelos plasmócitos de anticorpos para esse antígeno (Figura 28).

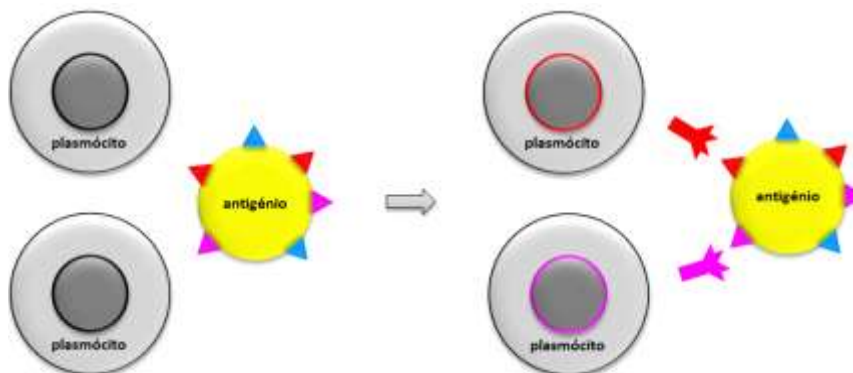


Figura 28 - Imunização

A escolha do animal a ser imunizado é condicionada pelo tipo de células de mieloma a utilizar posteriormente, pois sabe-se que fusão de DNA entre espécies iguais permite melhores resultados⁵.

A escolha da porta de entrada para a imunização é definida pelas características de solubilidade do antígeno. Caso o antígeno seja solúvel, pode ser utilizada a injeção endovenosa. Caso seja insolúvel, deve ser utilizada a injeção intraperitoneal, intradérmica ou intramuscular.

Em determinadas situações, a capacidade do antígeno para produzir uma resposta imunológica pode ser manipulada de modo a obter o máximo de resposta com um mínimo de antígeno. Pode-se, por exemplo, adicionar ao antígeno determinados reagentes, como o hidróxido de alumínio, que permitem a formação de um depósito localizado de antígeno no animal que consistentemente vai provocar a resposta imunológica sem que seja necessário o uso de injeções repetidas.

Na determinação da classe e a afinidade dos anticorpos produzidos existem alguns fatores que não podem ser controlados. Sabe-se, por exemplo, que a presença de elevado teor em glúcidos no antígeno tende a despoletar uma resposta sob a forma de IgM e ainda que as características individuais de cada animal vão estar envolvidas no tipo de imunoglobulina produzido após a imunização. No entanto, podem ser utilizadas algumas estratégias de modo a ser produzido o tipo de imunoglobulina pretendido, como, por exemplo, a utilização de uma única injeção para produzir a resposta imunitária vai originar uma resposta sob a forma de produção de IgM e que se forem utilizadas várias injeções, separadas por um espaço de tempo relativamente prolongado, a resposta tende a ser sob a forma de IgG⁵.

Os soros de IgG são mais procurados devido às menores dimensões desta molécula, o que possibilita uma maior capacidade de difusão tecidual e também devido à facilidade com que é digerida pela pepsina de modo a ser eliminada a porção Fc que pode originar falsas marcações. Mas, por vezes, é útil possuir um soro de IgM para um antígeno, que pode ser utilizado em técnicas de dupla marcação simultaneamente com um soro de IgG para outro antígeno.

É importante ter em conta que os anticorpos com maior afinidade para o antígeno são produzidos tardiamente e portanto deve-se esperar algum tempo entre a primeira injeção e a colheita de plasmócitos.

3.2.1.2 Escolha das células de mieloma a utilizar

Estão disponíveis comercialmente diversos tipos de linhas celulares de mieloma. Os mais utilizados são o X63-Ag8.653 para ratinho³⁰ e o YB213.0Ag3 (Y0) para ra-

tazana³¹, pois não produzem qualquer tipo de cadeia, permitindo assim que todos os anticorpos produzidos após a fusão sejam do tipo anteriormente produzido pelo plasmócito imunizado³².

3.2.1.3 Métodos de fusão entre células de mieloma e plasmócitos

O método mais utilizado é o que utiliza o polietileno glicol (PEG) como diminuidor da tensão superficial entre as membranas celulares das células do mieloma e as células do baço do animal utilizado, que, entretanto foi sacrificado para permitir a sua retirada. Uma vez diminuída a tensão superficial, as células fundem as suas membranas celulares e numa posterior mitose fundem o seu DNA o que resulta numa célula híbrida que mantém a imortalidade de uma célula-mãe e a capacidade de produzir anticorpos específicos da outra célula-mãe. Esta célula híbrida prolifera e dá origem a um clone³² (Figura 29).

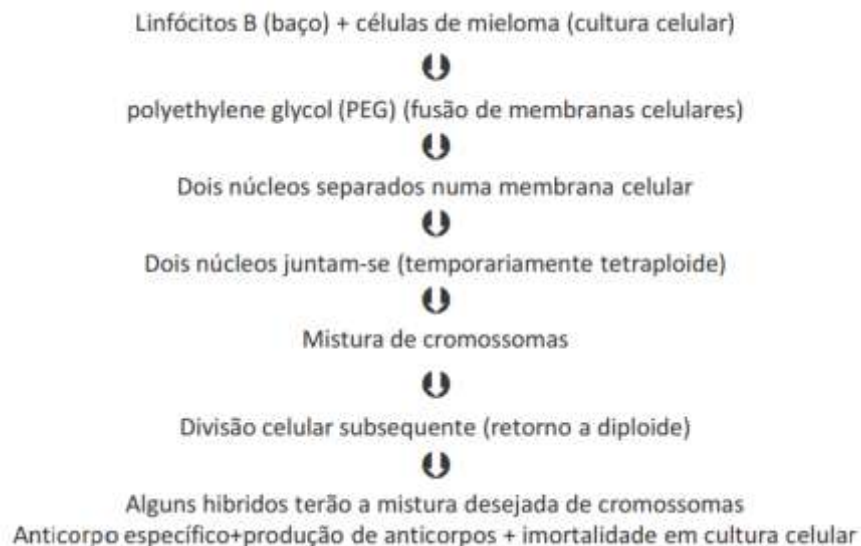


Figura 29 – Fusão de células de mieloma e plasmócitos

3.2.1.4 Selecção HAT

Após a junção, em meio de cultura, dos grupos de células de mieloma e dos plasmócitos, são aplicadas as técnicas de fusão anteriormente referidas e daí resultam três tipos de células³²: plasmócitos não hibridados, células de mieloma não hibridadas e células híbridas. Estas células serão triadas pela adição ao meio de cultura de Hipoxantina, Aminopterina e Timidina (HAT)³³.

Os plasmócitos apenas vão sobreviver em cultura de tecidos durante cerca de 1 semana, pois possuem um número limitado de ciclos de replicação.

As células de mieloma serão eliminadas, pois a aminopterina bloqueia a síntese de nucleótidos pela via *de novo*. A célula tenta a via *salvage* mas sendo deficiente em enzima (HPGRT) não consegue ativar esta via e morre.

As células híbridas que são o objetivo desta técnica, conseguem sintetizar nucleótidos pela via *salvage*, pois possuem enzima (HPGRT) e têm disponíveis os precursores para esta via (hipoxantina e timidina). Assim, estas células sobrevivem porque a célula-mãe normal lhes fornece capacidade de produzir a enzima (HPGRT) e o mieloma imortaliza a sua linha celular³⁴.

3.2.1.5 Seleção de clones

As células híbridas são testadas por etapas até se individualizarem clones produtores de anticorpos para o antígeno pretendido. Os testes podem ser feitos por imunohistoquímica, aplicando os sobrenadantes ricos em anticorpos das culturas onde repousam as células híbridas como soros primários de uma técnica de imunofluorescência indirecta².

3.2.1.6 Produção alargada de soro monoclonal.

A partir do momento em que um sobrenadante de um clone é intensivamente testado e é comprovada a sua viabilidade, este pode ser utilizado nas técnicas correntes. A cultura pode então produzir soro durante muito tempo, desde que mantida em boas condições. O sobrenadante é assim regularmente recolhido e comercializado pelo seu produtor. Existe ainda a hipótese de inocular o clone de células na cavidade abdominal de um ratinho e recolher regularmente o líquido ascítico que se desenvolve e que é muito rico em anticorpos específicos³⁵.

3.2.1.7 Purificação, digestão e conjugação de anticorpos.

Os anticorpos podem ainda sofrer alguns tratamentos na pós-produção que contribuam para a sua eficiência técnica. Alguns exemplos mais usuais são a remoção das porções pFc' pela ação da pepsina (Figura 11) e a conjugação com moléculas marcadoras. Cada uma destas intervenções é feita sempre com recurso a técnicas específicas para esse fim.

3.2.1.8 Armazenamento de anticorpos.

Caso possuam conservantes químicos específicos, os soros podem ser conservados no frigorífico a 4°C durante alguns anos. O conservante antimicrobiano mais utilizado é a azida de sódio ou *sodium azide* (NaN₃) a 0.02 - 0.05%³⁶.

Em alguns casos os soros sem conservantes químicos podem ser conservados durante vários anos em câmaras frigoríficas a -70°C, mas uma vez descongelados poderão permanecer a 4°C somente durante alguns meses. Neste casos não é recomendada a repetição de ciclos de congelação-descongelação que podem danificar as estruturas proteicas de forma irrecuperável³⁶.

3.3 Soros Monoclonais versus Soros Policlonais

Cada um dos tipos de soros referidos anteriormente possui vantagens e desvantagens quando comparado com o outro tipo. Os soros monoclonais destacam-se por possuírem alta especificidade e homogeneidade enquanto os policlonais são geralmente menos dispendiosos e mais fáceis de obter (Tabela 5).

Tabela 5 – Vantagens e desvantagens de soros policlonais e monoclonais

Soros Monoclonais	Vantagens	Maior especificidade e afinidade	
		Determinação de um só epítipo de um antigénio	
Soros Monoclonais	Vantagens	Maior homogeneidade	
		Ausência de anticorpos não específicos	
		Maior facilidade de caracterização	
		Menor variabilidade de lote para lote	
		Desvantagens	Maior custo
			Epítipo detetável destruído implica negatividade mesmo que exista antigénio
	Existência de outros antigénios com o epítipo selecionado		
Soros Policlonais	Vantagens	Maior dificuldade de obtenção em grandes quantidades	
		Menor custo	
		Capacidade para detetar um antigénio mesmo na ausência de vários dos seus epítipos	
	Desvantagens	Maior facilidade de obtenção em grandes quantidades	
		Menor especificidade	
		Determinação de vários epítipos que podem pertencer a vários antigénios	
Menor homogeneidade			
Possibilidade de presença de anticorpos não específicos			
Maior dificuldade de caracterização			
Maior variabilidade de lote para lote			

3.4 Manuseamento de Soros

Para se conseguir o máximo de qualidade nas marcações de imunohistoquímica é importante que na utilização de todos os soros se sigam as regras de manuseamento e armazenamento que são indicadas pelo fabricante na literatura que os acompanha.

3.5 Receção

Assim que se recebe um soro no laboratório é muito importante que se proceda ao seu armazenamento, de acordo com as indicações do fabricante. Normalmente é indicado o seu armazenamento no frigorífico a 4°C. Cada soro deverá ser registado indicando: o lote, data de validade, data de receção e número da nota de encomenda. Estes dados serão úteis para controlo e em caso de posterior reclamação.

3.6 Armazenamento e conservação

Os principais fatores a ter em conta quando se fala em armazenamento de soros são: os frascos contentores, a temperatura e a manipulação diária.

3.6.1 Frascos contentores

Deverão ser utilizados frascos de polipropileno, policarbonato ou de vidro borossilicado, pois possuem uma baixa capacidade de absorção de proteínas. É também útil utilizar frascos transparentes pois permitem uma rápida inspeção (Figura 30).



Figura 30 – Frascos contentores

Fonte: http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/ps/products/affinity_media/sku_view/global/156-3004_view.jpg

3.6.2 Temperatura

Este fator é talvez o mais determinante quando se fala em conservação de anticorpos.

Todas as indicações dos fabricantes deverão ser seguidas criteriosamente em relação a esta condicionante. Os frigoríficos e arcas congeladoras utilizados para armazenar anticorpos devem ter indicação digital da temperatura e devem ser monitorizados regularmente para prevenir eventuais flutuações. Deverá existir um sistema de *Back-up* para compensar eventuais falhas de energia. É também de evitar o "descongelar/congelar" diário dos soros que requerem congelação, mantendo-se uma pequena quantidade de soro a 4°C para uso de curta duração.

3.6.3 Manipulação diária

O tratamento adequado dos soros durante a sua utilização previne a sua deterioração ou contaminação. Deve-se manter o reagente afastado do calor e da luz solar direta, para além de se proceder à sua rápida devolução ao local de armazenamento após utilização. É também importante utilizarem-se pontas descartáveis para recolha de soros.

3.6.4 Azida de sódio

Os reagentes biológicos utilizados em imunohistoquímica recorrem à azida de sódio (NaN_3) como conservante. Este produto químico é altamente tóxico na forma pura, no entanto, as concentrações utilizadas nos referidos reagentes (15 mmol/L) são extremamente baixas e, conseqüentemente, apresentam pouco risco. Em situações de elevada concentração do produto, embora não sendo classificada como perigosa, a azida de sódio pode reagir com as canalizações de chumbo e de cobre, formando acumulações de azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar o soros de imunohistoquímica, deve-se adicionar água abundante para evitar a acumulação de azidas metálicas na canalização³⁷.

4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

4.1 Métodos de Imunofluorescência

Dá-se a designação de imunofluorescência aos métodos de imunohistoquímica que utilizam moléculas fluorescentes como substâncias propiciadoras da visualização do antígeno (Figura 31).

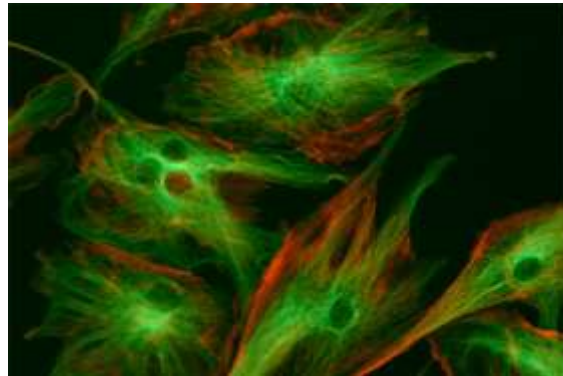


Figura 31 – Imunofluorescência

Fonte: <http://www.microscopyu.com>

Estes métodos exigem a utilização de um microscópio especial para a visualização das marcações, com uma lâmpada que emite radiação com comprimento de onda no campo dos ultravioletas de 480-590 nm (Figura 32).

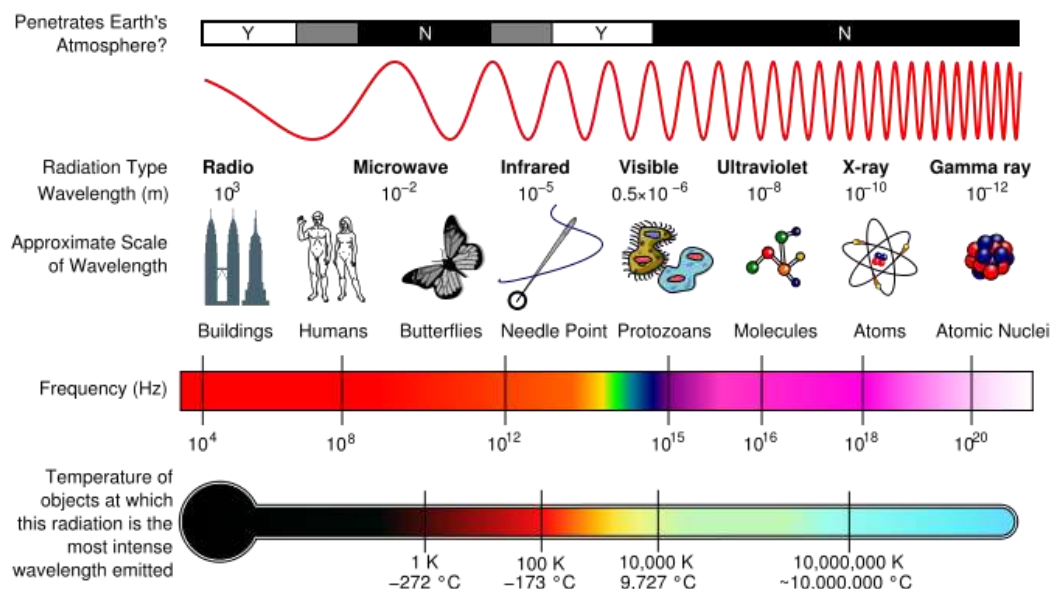


Figura 32 – Espectro de radiações

Fonte: [http://chemwiki.ucdavis.edu/@api/deki/files/9199/675px-](http://chemwiki.ucdavis.edu/@api/deki/files/9199/675px-EM_Spectrum_Properties_edit.svg.png?size=bestfit&width=675&height=400&revision=1)

[EM_Spectrum_Properties_edit.svg.png?size=bestfit&width=675&height=400&revision=1](http://chemwiki.ucdavis.edu/@api/deki/files/9199/675px-EM_Spectrum_Properties_edit.svg.png?size=bestfit&width=675&height=400&revision=1)

As técnicas de imunofluorescência foram introduzidas por Albert Coons e pelos seus colaboradores em 1941 e, desde então, são aplicáveis tanto para diagnóstico como para investigação.

A fluorescência primária ou autofluorescência é aquela que certos tecidos ou órgãos apresentam sem haver necessidade de serem modificados. Por exemplo, a lâmina elástica das artérias mostra autofluorescência em determinadas circunstâncias. As técnicas de imunohistoquímica induzem fluorescência em determinadas substâncias que não tenham esta capacidade (fluorescência secundária) marcando, com fluorocromos, anticorpos dirigidos contra antígenos tecidulares.

As técnicas de imunofluorescência realizam-se quase sempre com tecido congelado pois existe a percepção de que o processo de fixação com formaldeído e a inclusão em parafina alteram a estrutura dos tecidos, provocando um aumento dos fenómenos de autofluorescência e o bloqueio de alguns determinantes antigénicos, no entanto, alguns estudos têm permitido perceber que isso é ultrapassável e existe a possibilidade de aplicar técnicas de imunofluorescência em tecidos fixados em formaldeído^{38,39}.

Na generalidade, estes métodos são de uso limitado no diagnóstico de rotina, pois as moléculas fluorescentes perdem atividade com o passar do tempo, não permitindo a conservação das lâminas em arquivo, e a contextualização tecidual e celular é limitada, sendo por isso pouco utilizadas neste contexto.

4.1.1 Fluorocromos

Fluorocromos são substâncias que têm a propriedade de absorver altas fontes de energia precedentes da radiação UV e do espectro de luz visível (Tabela 6). Assim, quando estas substâncias são iluminadas, há uma libertação gradual de energia que se prolonga mesmo sem a fonte luminosa. Este fenómeno denomina-se fosforescência.

Tabela 6 – Características de fluorocromos

Fonte: http://www.docstoc.com/docs/document-preview.aspx?doc_id=65801331

Dye	Excitation wavelength	Emission wavelength	Excitation laser lines (nm)	Fluorescence Channel
Methoxycoumarin	360	410		
DyLight [®] 405	400	420		
HiLyte Fluor [™] 405	404	428		
DyLight [®] 350	353	432		
Aminocoumarin	350	445		
Pacific blue [™]	404	456	360,405,407	FL1,FL6
EviTag [™] quantum dots-Lake Placid Blue	470	490		
Cy2 [®]	489	506	488	
Chromoem [™] 488	488	517		
DyLight [®] 488	493	518		
Alexa Fluor [®] 488	495	519	488	FL1,FL3,PM3
FAM	494	519		
Fluorescein Iso-thiocyanate (FITC)	495	519	488	FL1,FL3,PM3
EviTag [™] quantum dots-Adirondack Green	505	520		
Chromoem [™] 505	505	528		
HiLyte Fluor [™] 488	501	527		
EviTag [™] quantum dots-Catskill Green	525	540		
Alexa Fluor [®] 430	434	541		
Alexa Fluor [®] 532	532	554		
HEX	535	556		
EviTag [™] quantum dots-Hops Yellow	545	560		
Chromoem [™] 546	545	561		
Cy3 [®]	548	561	488,514	FL2,FL4,PM1
Alexa Fluor [®] 555	555	565		
HiLyte Fluor [™] 555	550	565		
5-TAMRA	541	568		
Alexa Fluor [®] 546	556	573		
DyLight [®] 549	562	576		
Phycocerythrin (PE)	496,566	576	488	FL2,FL4,PM1
Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate (TRITC)	557	576		
EviTag [™] quantum dots-Birch Yellow	560	580		
Cy3.5 [®]	576	580	568,543	
Rhodamine Red-X	570	590		
PE-Dyomics [®] 590	488	599		
EviTag [™] quantum dots-Fort Orange	585	600		
ROX	575	602		
Alexa Fluor [®] 568	578	603		
Red 613	480,565	613		
Texas Red [®]	595	613	568,543,514	
HiLyte Fluor [™] 594	593	616		
PE-Texas Red [®]	566	616		
Alexa Fluor [®] 594	590	617		
DyLight [®] 594	593	618		
EviTag [™] quantum dots-Maple-Red Orange	600	620		
Chromoem [™] 494	494	628		
Alexa Fluor [®] 633	632	647		
SureLight [®] APC	652	657		
DyLight [®] 633	638	658		
Allophycocyanin (APC)	650	660	595,633,635,647	FL4,FL7,FL8
Chromoem [™] 642	642	660		
Quantum Red	488	660		
SureLight [®] P3	614	662		
Alexa Fluor [®] 647	650	665	595,633,635,647	FL4,FL7,FL8
Cy5 [®]	647	665	633,635	FL4,FL8
PE-Cy5 [®]	665	666	488	FL3,FL4,FL6,PM2
SureLight [®] P1	545	666		
PE-Alexa Fluor [®] 647	567	660		
PE-Dyomics [®] 647	488	672		
DyLight [®] 649	654	673		
HiLyte Fluor [™] 647	650	675		
Peridinin Chlorophyll (PerCP)	477	678	488	FL3,FL4,FL6,PM2
IRDye [®] 700DX	680	687		
Alexa Fluor [®] 660	663	690		
PE-Cy5.5 [®]	565	693	488	FL3,FL4,FL6,PM2
APC-Cy5.5 [®]	690	694	595,633,635,647	FL3,FL4,FL7
Cy5.5 [®]	675	694	647	
TruRed	490,675	695		
HiLyte Fluor [™] 680	678	699		
Alexa Fluor [®] 680	679	702		
DyLight [®] 680	692	712		
APC-Cy7 [®]	650	774	595,633,635,647	FL5,FL8,FL9
Cy7 [®]	753	775		
PE-Dyomics [®] 747	488	776		
DyLight [®] 750	752	778		
HiLyte Fluor [™] 750	753	778		
PE-Cy7 [®]	566	778	488	FL3,FL5,PM4
IRDye [®] 800RS	770	786		
DyLight [®] 800	777	794		
IRDye [®] 800CW	778	794		

Os fluorocromos mais utilizados nas técnicas de imunofluorescência são a fluoresceína e a rodamina. A fluoresceína usa-se quase sempre sob a forma de isotiociana-

to (FITC), que absorve a luz azul e emite fluorescência verde. A rodamina usa-se na forma de isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), absorvendo luz verde e emitindo fluorescência vermelha (Tabela 7).

Tabela 7 – Características dos Fluorocromos

Composto	Forma activa	λ absorvido	λ emitido	Tonalidade
Fluoresceína	Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	480-500 nm	510-530 nm	Verde
Rodamina	Isotiocianato de Tetrametilrodamina (TRITC)	510-530 nm	560-590 nm	Laranja/vermelho
Texas Red	Texas Red (TR)	580-590 nm	600-620 nm	Vermelho

Para ser utilizado em imunofluorescência, um fluorocromo deverá ter determinadas características:

- A. Não deve interferir com a relação antigénio-anticorpo;
- B. O seu armazenamento deverá ser estável;
- C. Deverá encontrar-se disponível na sua forma purificada;
- D. A sua emissão deverá ser máxima no espectro do visível;
- E. O comprimento de onda da luz absorvida e da luz emitida devem ser muito diferentes para que possam diferenciar-se facilmente.

Os fluorocromos podem ligar-se de forma covalente aos anticorpos sem alterar as suas propriedades e estes últimos ligam-se depois aos antigénios. Assim, os fluorocromos ligados a anticorpos específicos constituem um meio útil para visualizar zonas onde ocorra a reacção antigénio-anticorpo. Também podem marcar-se os anticorpos específicos com fluorocromos distintos realizando marcação múltipla.

4.1.2 União dos fluorocromos a anticorpos

O tipo de ligação depende do tipo de fluorocromo. O FITC e o TRITC associam-se ao anticorpo através de ligações covalentes com os grupos amina e carboxilo dos anticorpos. Esta ligação deve ser feita em pH alcalino e devem usar-se moléculas purificadas para que os fluorocromos não se liguem a outras proteínas e originem falsas marcações.

4.1.3 Microscópio de fluorescência

Para a visualização das técnicas de imunofluorescência deve usar-se um microscópio de fluorescência (Figura 33). Este tipo de microscópio tem incorporado:

1. Fonte de luz UV e visível;
2. Filtros primários (ou de excitação) que selecionam o comprimento de onda que vai incidir sobre a amostra;
3. Filtro secundário (ou de emissão) que seleciona os comprimentos de onda emitidos dentro do espectro de luz visível, deixando passar apenas a luz emitida por uma substância fluorescente.

A fonte de luz pode ser uma lâmpada de vapor de mercúrio a alta pressão ou uma lâmpada halogénea de quartzo. A primeira produz mais energia e é preferível quando se pretende uma imunofluorescência de baixa intensidade. No entanto, é dispendiosa, há risco de explosão e perde a intensidade com o tempo. Existem dois tipos de microscópios de imunofluorescência: o microscópio de transmissão e o de luz de incidência.

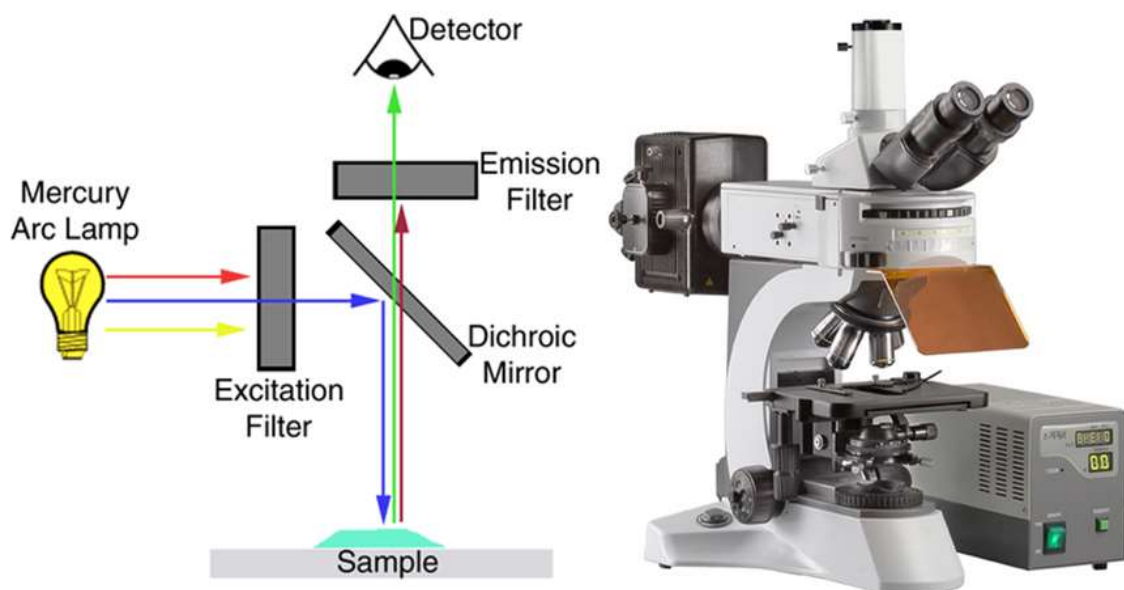


Figura 33 – Microscópio de Fluorescência

Fonte: http://www.jic.ac.uk/microscopy/more/t5_6.htm

4.1.4 Microscopia de Imunofluorescência no diagnóstico

A utilização da imunofluorescência para o diagnóstico das doenças glomerulares do rim é tão importante que algumas delas devem seu nome a particularidades da técnica⁴⁰. As glomerulopatias podem apresentar-se com imunofluorescência nega-

tiva (doenças glomerulares não imuno mediadas). Porém, a maioria apresenta imunofluorescência positiva para anticorpos anti-IgA, IgG, IgM ou complementos C1, C3 ou C4, que pode ter padrão linear ou padrão granular (cerca de 95%). Quando o padrão da imunofluorescência é fortemente linear é feito o diagnóstico de Doença Glomerular por anticorpos anti membrana basal glomerular. Essa doença quando associada ao componente pulmonar é chamada de Doença de Goodpasture⁴¹ (Figura 34).

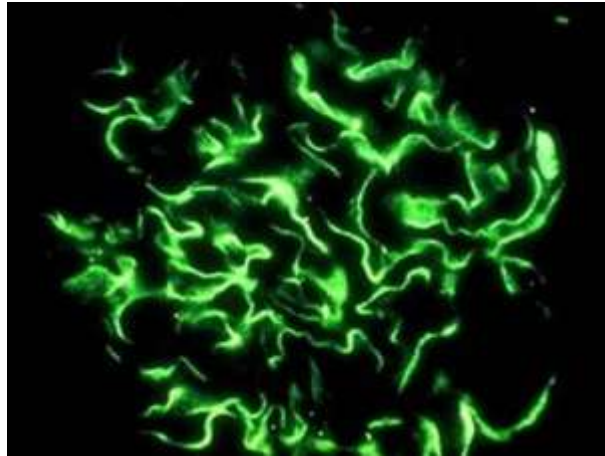


Figura 34 - IgG em padrão linear.

Fonte: http://classconnection.s3.amazonaws.com/33/flashcards/602033/jpg/gps_vs_sle1317950166424.jpg

Quando o padrão é granular evidencia-se outra patologia glomerular cujo diagnóstico exige a técnica de imunofluorescência que é a Glomerulopatia de IgA, quando a imunoglobulina detetada pela imunofluorescência é a IgA⁴² (Figura 35).

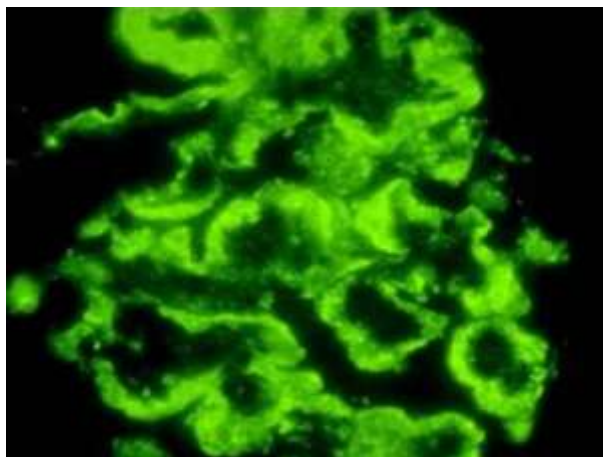


Figura 35 - Imunofluorescência positiva para IgA em padrão granular

Fonte: http://classconnection.s3.amazonaws.com/33/flashcards/602033/jpg/gps_vs_sle1317950166424.jpg

5 IMUNOENZIMOLOGIA

Dá-se o nome de imunoenzimologia aos métodos de imunohistoquímica que utilizam enzimas como substâncias propiciadoras da visualização do antígeno. São os métodos mais utilizados atualmente, pois permitem a visualização em microscópio óptico comum e a obtenção de preparações permanentes⁵ (Figura 36). Permitem ainda a visualização da estrutura geral do tecido em simultâneo com a marcação imunohistoquímica.

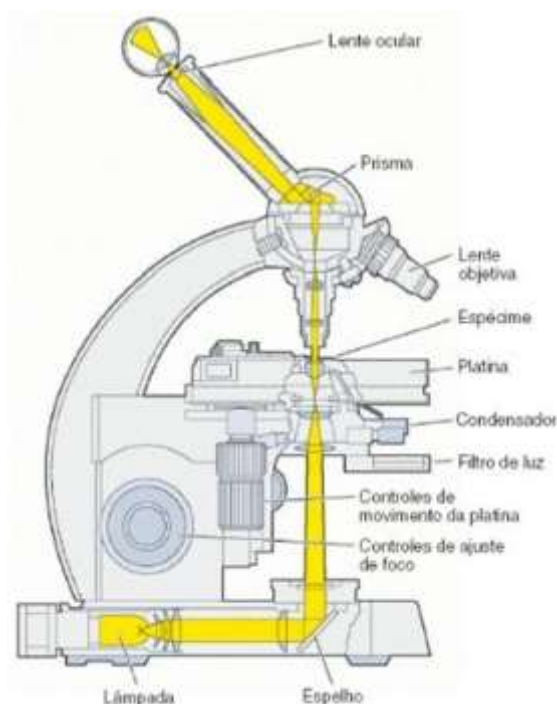


Figura 36 – Microscópio óptico.

Fonte: <http://biogv.webnode.com.br/a1%C2%BA%20a/>

5.1 Enzimologia Básica

As enzimas são catalisadores biológicos muito potentes e eficazes, responsáveis pela maior parte das reações químicas que mantêm a homeostasia. Como possuem um papel muito importante ao nível dos processos dos seres vivos, tornam-se chaves importantes no diagnóstico clínico e terapêutica.

As enzimas podem ser classificadas, com base na sua composição, em enzimas simples, que são constituídas apenas por proteínas, e enzimas complexas, quando são compostas por proteínas e uma pequena quantidade de moléculas orgânicas⁴³.

As enzimas complexas também são denominadas holoenzimas, cujo componente proteico é denominado apoenzima e o componente não-proteico coenzima ou grupo prostético (e.g. protoporfirina de ferro da peroxidase). Quando a coenzima é um íon ou molécula inorgânica, denomina-se cofator⁴³ (Figura 37).

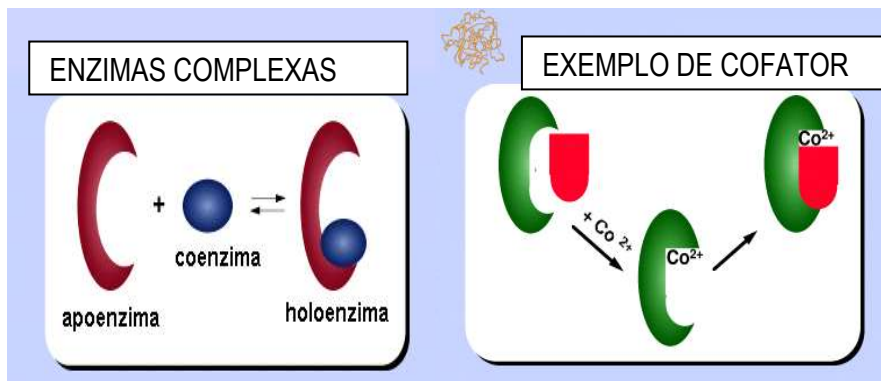


Figura 37 – Enzimas e Co-fatores

<http://www.bio12.com/ch6/RemedialEnzymes.htm>

As enzimas podem ser encontradas em todos os tecidos e fluidos do corpo, como:

- Enzimas intracelulares – catalisam as reações da “cascata metabólica”;
- Enzimas da membrana plasmática - regulam a catálise dentro das células em resposta a sinais extracelulares;
- Enzimas do Sistema Circulatório - responsáveis pela regulação da coagulação sanguínea.

5.1.1 Papel Catalisador

Um catalisador é uma substância que acelera uma reação química, diminuindo a energia de ativação. Como catalisadores as enzimas atuam em pequena quantidade, não levando a cabo reações que sejam energeticamente desfavoráveis, não modificando o sentido dos equilíbrios químicos, mas sim acelerando o seu processo⁴³ (Figura 38).

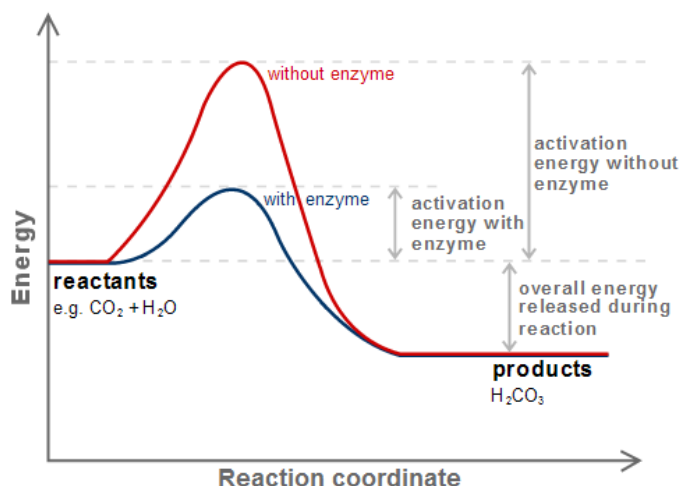


Figura 38 – Papel catalisador das enzimas numa reação

Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fe/Carbonic_anhydrase_reaction_in_tissue.svg

5.1.2 Características das Enzimas

As enzimas possuem a capacidade de distinguir de forma específica o substrato sobre o qual agem (Especificidade do Substrato) e cada reação é catalisada por uma enzima específica (Especificidade de Ação).

A reação entre enzima e substrato descreve-se da seguinte forma:



A ação enzimática caracteriza-se pela formação de um complexo que representa o estado de transição, logo é necessário a formação do complexo enzima - substrato antes da obtenção do produto final. O substrato une-se ao centro ativo da enzima através de numerosas interações (e.g. pontes de hidrogénio, ligações eletrostáticas e ligações hidrofóbicas). O centro ativo é uma pequena porção da enzima, constituída por uma série de aminoácidos que interatuam com o substrato⁴³.

5.1.3 Modelos de Interação Enzima/Substrato

5.1.3.1 Modelo de Fischer – Chave/Fechadura

Elaborado por Fisher no início do século passado, é baseado no princípio de que as enzimas são muito específicas e só atuam sobre determinados substratos, catalisando reações. Fisher sugeriu que esta especificidade é devida ao facto dos substratos encaixarem perfeitamente no centro ativo das enzimas, provocando a aber-

tura ou fecho desta. De acordo com este modelo o centro ativo é uma estrutura rígida, havendo assim um ajuste perfeito entre enzima e o substrato^{44,45}.

5.1.3.2 Modelo de Koshland - Encaixe Induzido

De acordo com este modelo, a enzima e o centro ativo não são estruturas rígidas. O substrato que tem afinidade para determinada enzima liga-se ao centro ativo, modificando-o, de modo que haja um encaixe perfeito do substrato à enzima. Exerce-se assim uma força sobre o substrato, quebrando ligações da molécula ou estabelecendo outras (reações de catálise ou de síntese). Assim se explica a especificidade relativa das enzimas, isto é, uma enzima pode catalisar alguns substratos com diferenças estruturais pequenas⁴⁶.

5.1.4 Fatores que afetam a Atividade Enzimática

Existem diversos fatores que afetam a atividade enzimática. Um deles é a concentração enzimática, sabendo-se que a velocidade de transformação do substrato é proporcional à concentração da enzima. Outro dos fatores é a concentração do substrato, pois a atividade enzimática aumenta com o aumento da concentração do substrato até à saturação da enzima. Temos ainda o pH, que pode afetar de diferentes maneiras: o centro ativo pode conter aminoácidos com grupos ionizados que podem variar com o pH do meio, a ionização dos aminoácidos que não estão no centro ativo pode provocar modificações na conformação das enzimas ou o substrato pode ser afetado por variações do pH. Um pH extremo modifica irreversivelmente a estrutura da enzima, desnaturando a proteína e em certos casos modifica a ligação entre a apoenzima e a coenzima. Algumas enzimas apresentam variações peculiares, como por exemplo: a pepsina do estômago apresenta um pH ideal de 2.0, enquanto a fosfatase alcalina do intestino apresenta um pH ideal de 12.0. A temperatura também influencia fortemente a atividade enzimática. Uma determinada temperatura representa o máximo da atividade enzimática, mas quando se supera um valor considerável (normalmente acima dos 50°C) a atividade enzimática cai bruscamente, pois a enzima sofre uma desnaturação. E, finalmente, temos a concentração de sais e iões da solução envolvente, pois algumas enzimas necessitam que estejam presentes iões metálicos (e.g. Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺) que funcionam como agentes eletrofilicos⁴³.

5.1.5 Classificação das Enzimas

As enzimas podem ser divididas em 6 tipos⁴⁷:

Classe 1: Oxirredutases - Catalisam reações de oxirredução, transferindo eletrões, hidretos (H-) ou protões (H+) (Figura 39).

Classe 2: Transferases - Transferem grupos químicos entre moléculas. São denominadas Quinases (Figura 40).

Classe 3: Hidrolases - Utilizam a água como recetor de grupos funcionais de outras moléculas (Figura 41).

Classe 4 - Liases - Formam ou destroem ligações duplas, respetivamente retirando ou adicionando grupos funcionais.

Classe 5 - Isomerases - Transformam uma molécula num isómero.

Classe 6 - Ligases - Formam ligações químicas por reacções de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP

Existem as oxirredutases que atuam em reações de Oxidação-Redução. Nestas reações há uma molécula que se reduz e outra que se oxida.

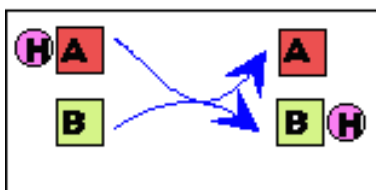


Figura 39 - Reação de oxidação-redução

Fonte: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/enzimas.htm

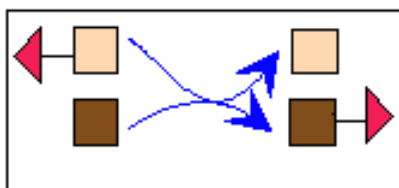


Figura 40 - Reação de transferência

Fonte: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/enzimas.htm

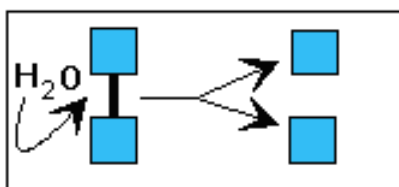


Figura 41 - Reação de hidrólise

Fonte: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/enzimas.htm

5.1.6 Tipos de Inibição

Podem existir dois tipos de inibição. Por um lado temos a inibição competitiva, que ocorre em enzimas que têm a capacidade de se ligar a mais do que um substrato, sabendo-se que se o inibidor se liga à enzima ao nível do centro ativo, diminui a sua afinidade para o substrato. Temos ainda a inibição não competitiva, na qual o inibidor se liga à enzima no centro alostérico (zona específica extra centro ativo), levando a uma alteração da configuração do centro ativo, o que faz com que a enzima tenha dificuldade a ligar-se ao substrato⁴³.

5.2 Imunoenzimologia

Os métodos de marcação imunoenzimáticos utilizam reações do tipo enzima-substrato para obterem produtos finais coloridos a partir de cromogénios incolores.

As enzimas mais utilizadas são:

- A. Peroxidase (*Horseradish Peroxidase* – HRP);
- B. Fosfatase Alcalina (*Calf intestine Alkaline Phosphatase*);
- C. Glucose Oxidase (*Aspergillus niger glucose oxidase*).

São critérios úteis para seleção de enzimas para utilização em imunohistoquímica⁵:

- A. A enzima deve existir em grandes quantidades na natureza numa forma altamente pura e ser pouco dispendiosa;
- B. A conjugação não deve anular a atividade enzimática;
- C. A enzima conjugada deve ser estável em solução;
- D. A atividade da enzima endógena não deve interferir em grande escala com a técnica;
- E. Os produtos da reação enzimática devem ser facilmente detetados e permanecerem estáveis durante longos períodos.

5.2.1 Horseradish Peroxidase – HRP

A enzima mais utilizada é a *Horseradish Peroxidase* ou HRP obtida da raiz do rábano *Armoracia rusticana* (Figura 42)⁴⁸. Esta molécula possui um peso molecular de 40 kDa e é bastante estável. Como pó liofilizado, pode ser guardado durante mui-

tos anos a 4°C. Em solução aquosa (1mg/ml) pode ser mantida mais do que um ano a 4 °C, sem diminuição da atividade.

Possui ainda outras particularidades muito vantajosas⁵:

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



Figura 42 – Horseradish

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

A peroxidase pode ser dividida em mais de 30 isoenzimas, sendo que a forma predominante é a isoenzima C (HRP C), uma glicoproteína monomérica com peso molecular de aproximadamente 44 kDa (Figura 43).

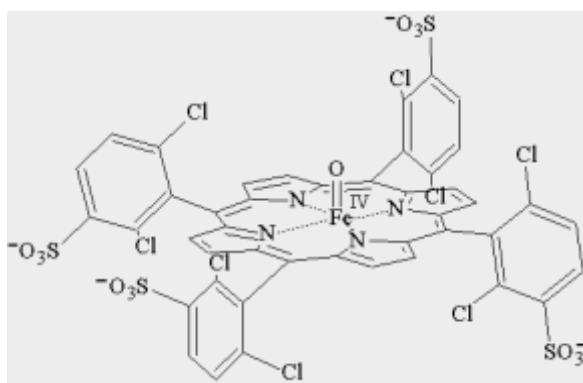


Figura 43 – Estrutura química da HRP

Fonte: <http://www.york.ac.uk/depts/chem/staff/jrls.html>

É caracterizada como uma única cadeia de polipeptídeo com 308 resíduos, com um resíduo N-terminal bloqueado por piroglutamato. É fortemente glicosilada (18% em massa) e contém um único grupo de protoporfirina IX como grupo pros-

tético, dois íons de cálcio, quatro pontes dissulfeto, e oito cadeias de carboidratos *N-linked*. Contém um grupo de base férrica (hematina) no seu centro ativo (Figura 43), possuindo, em solução, cor castanha⁴⁹.

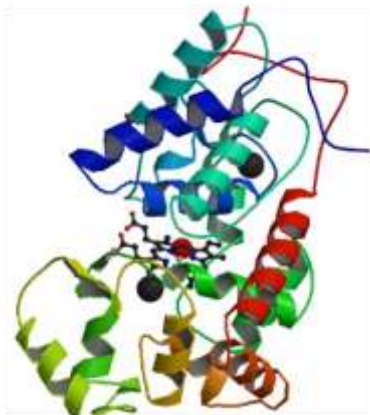


Figura 44 – Estrutura tridimensional da HRP. O grupo heme está localizado no centro com o átomo de ferro a vermelho e os íons de cálcio são as esferas pretas

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

A hematina da peroxidase forma um complexo com o peróxido de hidrogénio (substrato) provocando a sua decomposição em água (H₂O) e oxigénio atómico⁵. A peroxidase também pode oxidar outras substâncias como os nitratos e os polifenóis⁵⁰.

Pode ser conjugada com outras proteínas de duas maneiras:

- A. Ligação covalente:
 - a. Pode ser realizada utilizando o glutaraldeído;
 - b. Estão envolvidos os grupos E-amino da lisina e os grupos N-terminal de ambas as proteínas.
- B. Ligação não-covalente:
 - a. ligação anticorpo / peroxidase através da porção Fab (Complexo PAP).

Em imunohistoquímica, a HRP oxida indiretamente os cromogénios ao reagir com o peróxido de hidrogénio. Os cromogénios utilizados são substâncias que na sua forma oxidada são coloridas e estáveis, conferindo cor ao local da reação. Existe sob a forma de peroxidase endógena em várias estruturas humanas como os glóbulos vermelhos.

5.2.1.1 Substratos e Cromogénios

A HRP, em presença de peróxido de hidrogénio, forma, numa primeira fase, um complexo enzima-substrato, e, posteriormente, oxida um dador de eletrões que permite que a reação prossiga na degradação do peróxido em água e oxigénio livre. Alguns dadores de eletrões uma vez oxidados tornam-se coloridos e portanto são designados cromogénios. Este facto associado à capacidade de precipitarem no local da reação após a oxidação, torna-os muito úteis em imunohistoquímica, pois permite identificar a presença e localização do antigénio⁵ (Figura 45).

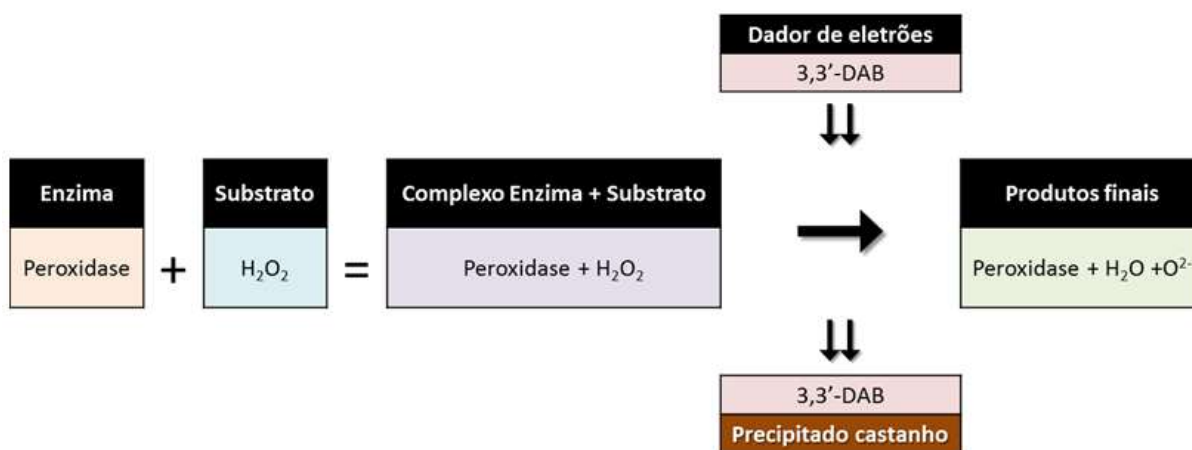


Figura 45 – Representação esquemática da revelação por DAB

O cromogénio mais utilizado é a 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB) que gera um precipitado castanho/bronze insolúvel em álcool e noutros solventes orgânicos (Figura 46).

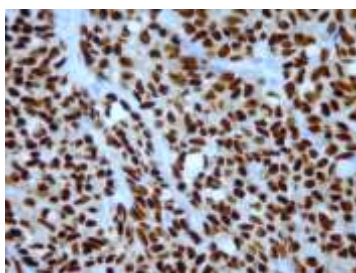


Figura 46 – Imunomarcção por DAB

A sua oxidação causa a polimerização, permitindo a reação com o tetróxido de ósmio, aumentando a intensidade da cor e permitindo o surgimento da densidade para os eletrões, que pode ser útil em microscopia eletrónica⁵¹.

O composto final pode mudar a sua cor para negro caso seja utilizado, em simultâneo com a oxidação, o cloreto de níquel. Pode também intensificar-se a cor castanha caso seja utilizado, em simultâneo com a oxidação, o sulfato de cobre⁵¹.

Por sua vez, o cromogénio 3-Amino-9-Etilcarbazol (AEC) após oxidação forma um produto final vermelho-rosado, solúvel no álcool (Figura 47). Devem ser utilizados um meio de montagem e um contraste aquosos. No entanto, existem atualmente alguns meios de montagem permanentes que podem também ser utilizados⁵² (e.g. Ultramount - Dako™).

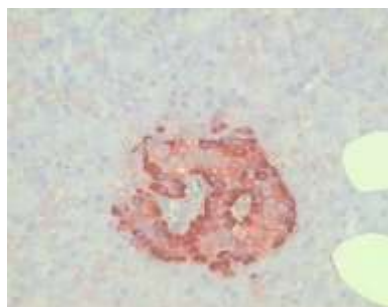


Figura 47 - Revelação por AEC

O cromogénio 4-Cloro-1-Naftol (CN) forma um produto final azul. É solúvel em álcool e noutros solventes orgânicos. Tende a difundir-se do local onde precipita.

5.2.2 Fosfatase Alcalina (Calf intestine Alkaline Phosphatase);

A Fosfatase Alcalina possui um peso molecular de 100 kDa e tem com função principal remover por hidrólise e transferir grupos fosfatos de ésteres orgânicos, quebrando as ligações P-O. É formada uma ligação temporária entre a enzima e o substrato - PO_4 . Estas reações são ativadas por diversos iões metálicos como: Mg^{++} , Mn^{++} e Ca^{++} .

Não era muito utilizada em Imunohistoquímica até surgir o método APAAP, que tem como principal vantagem o facto de evitar a atividade endógena da peroxidase. É recomendada a sua utilização em esfregaços e tecidos com muito sangue. Para a inibição da fosfatase alcalina endógena do osso, rim, fígado e glóbulos brancos, recomenda-se a utilização de Levamisole, que é adicionado à solução de revelação.

5.2.2.1 Substratos e Cromogénios

A enzima hidrolisa os ésteres de fosfato-naftol (substratos) em compostos fenólicos e fosfatos. Os fenóis reagem com os sais incolores de Diazonium (cromogénio) para produzir corantes azo.

Podem ser utilizadas diferentes combinações de substrato/cromogénio como o 5-Bromo-4-Cloro-Indolil Fosfato (BCIP)/Nitro Blue Tetrazolium (NBT).

O BCIP é hidrolisado pela fosfatase alcalina levando à formação de um composto temporário que posteriormente é dimerizado para produzir um corante de índigo. O NBT é reduzido a formazan pela dimerização do composto anterior (Figura 48).

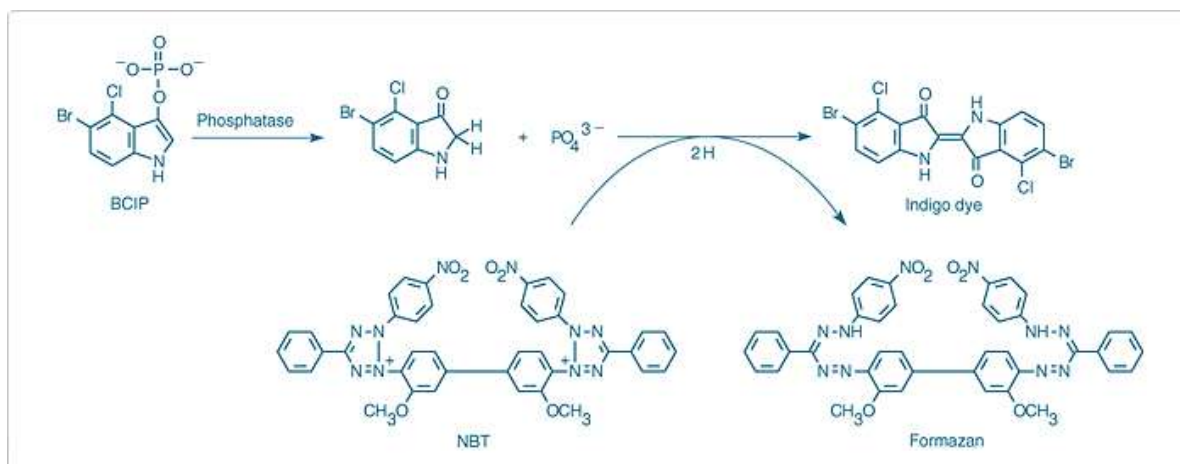


Figura 48 – Reação de revelação da fosfatase alcalina por NBT-BCIP

Fonte: http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/References/the-handbook/ ultrasensitive-Detection-Technology/Enzyme-Labeled-Fluorescence.Par.35337.Image.-1.0.1.gif

Esta combinação de reagentes forma um precipitado azul a negro insolúvel em solventes orgânicos⁵² (Figura 49).

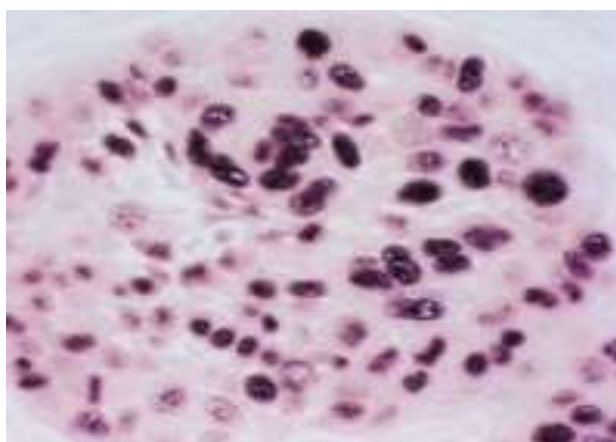


Figura 49 – Revelação por NBT-BCIP

Fonte: <http://www.maxim.com.cn/show/product/showlist.asp?id=128&tid=&tid1=4>

A *New Fuchsin*® é um cromogénio que produz um tom avermelhado, sendo insolúvel nos solventes orgânicos⁵². Possui uma intensidade bastante forte (Figura 50).

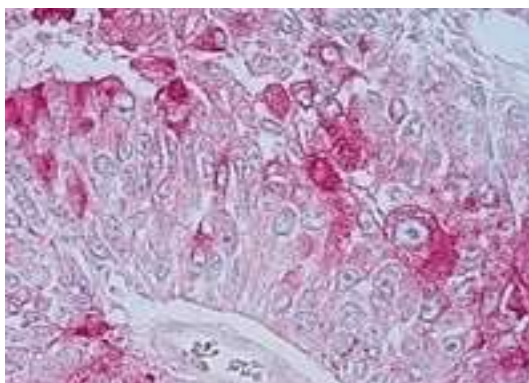


Figura 50 – Revelação por *New Fuchsin*

Fonte: <http://www.maxim.com.cn/show/product/showlist.asp?id=128&tid=&tid1=4>

O substrato Naftol As-Mx Fosfato pode ser utilizado na sua forma ácida ou de sal sólido (substrato) e, quando combinado com os cromogénios *Fast-Red TR* ou *Fast Blue BB*, produz uma cor vermelha (Figura 51) ou azul brilhante respetivamente, sendo estes solúveis em álcool e nos solventes orgânicos.

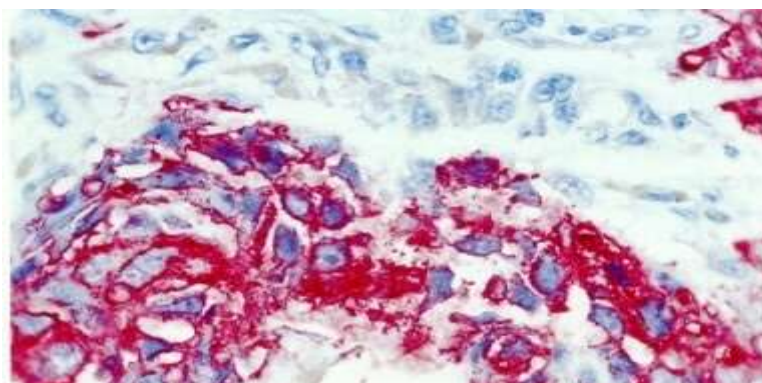


Figura 51 – Revelação por *Fast Red TR*

Fonte: <http://home.primus.com.au/royellis/hmb45.html>

Existem ainda outros Cromogénios como o *Fast Red LB* ou o *Fast Garnet GBC*.

5.2.3 Glucose Oxidase (*Aspergillus niger*)

Sendo uma holoenzima, a glucose oxidase possui 185 kDa e é constituída por duas subunidades idênticas, que estão ligadas entre si por ligações não covalentes. Existem cerca de 120 pontos de contacto entre os dímeros centrados à volta de 11 resíduos, formando cada um ligações de hidrogénio. Não existe nos mamíferos, o que significa que não existe atividade enzimática endógena. Possui pouca sensibilidade quando comparada com a fosfatase alcalina e com a peroxidase. As suas preparações são estáveis durante anos se guardadas no frio. No seu estado puro contém

polissacáridos como amilase, maltase e sucrase, que podem contribuir para falsos resultados.

5.2.3.1 Substratos e Cromogénios

Existem muitos sais cujos produtos de reação são apropriados para as técnicas de imunoenzimologia que utilizam a glucose oxidase, como o INT (2 (p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride) de cor violeta e solúvel no álcool. As lâminas devem ser montadas em meio de montagem aquoso.

5.2.4 Contraste

As colorações de contraste são escolhidas tendo em conta a cor do produto final obtido na técnica de imunohistoquímica.

Pode ser utilizada a Hematoxilina de Harris de cor azul (Figura 52), a Hematoxilina de Mayer de cor azul (Figura 53), o *Nuclear Fast Red* (Figura 54) ou *Kernechtrot* de cor vermelha ou ainda o *Methyl Green* (Figura 55) ou verde de metilo, de cor verde.

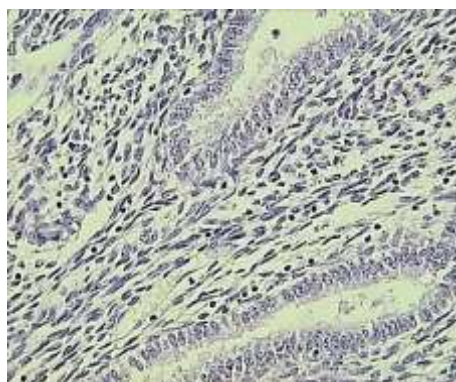


Figura 52 - Hematoxilina de Harris

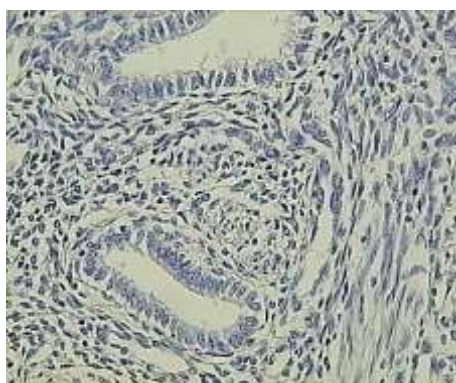


Figura 53 - Hematoxilina de Mayer

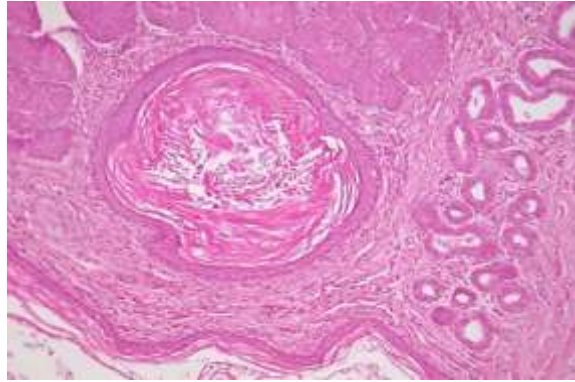


Figura 54 - Nuclear Fast Red

Fonte: http://www.vetmed.fu-berlin.de/einrichtungen/institute/we01/studium/histologie/uebungen_ss/index.html

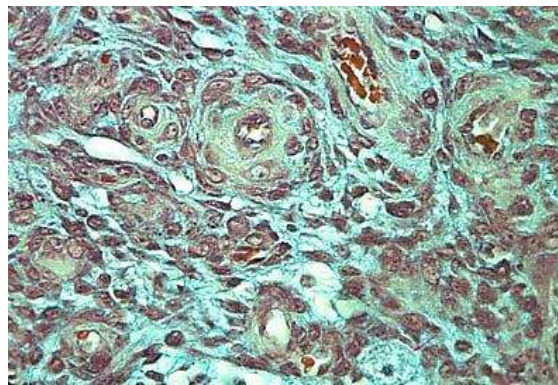


Figura 55 - Verde Metilo

Fonte: http://www.pathology-skin-rjreed.com/html/amf_dendritic_cells_.htm

6 MÉTODOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

Uma vez que os anticorpos, como proteínas que são, não possuem cor própria nem outra forma de serem visualizados nas preparações histológicas e citológicas, foi necessário encontrar forma de lhes conferir uma maneira de serem observáveis quando se encontram ligados aos antígenos que se querem detetar em Anatomia Patológica.

Existem atualmente diversos métodos aplicáveis a imunohistoquímica. A sua invenção teve praticamente sempre o mesmo denominador comum: a procura de uma ampliação de sinal mais potente. Todos ambicionaram continuamente associar o máximo de moléculas visualizáveis ao complexo anticorpo-antígeno.

Se no início, com Coons, a ampliação de sinal era medíocre, o que limitava a exequibilidade da imunohistoquímica a situações excepcionais e esporádicas, isso não toldou as potencialidades destas técnicas, tendo desde sempre os investigadores procurado identificar quantidades cada vez mais ínfimas de antígeno⁵³.

Ao longo dos anos têm sido desenvolvidas abundantes formas de aumentar o sinal (cor, fluorescência, etc.) que está associado ao antígeno tecidual. Algumas dessas metodologias não singraram e nunca obtiveram uma expansão relevante, outras tiveram muita aplicabilidade no seu tempo mas foram ultrapassadas e não são praticamente utilizadas nos dias de hoje. No entanto, todas possuem as suas vantagens e desvantagens que devem ser conhecidas para uma compreensão mais profunda da Imunohistoquímica.

6.1 Método Direto

Neste método é utilizado somente um anticorpo primário, que possui o marcador. Isto significa que o anticorpo que possui o marcador se liga diretamente ao antígeno (Figura 56).

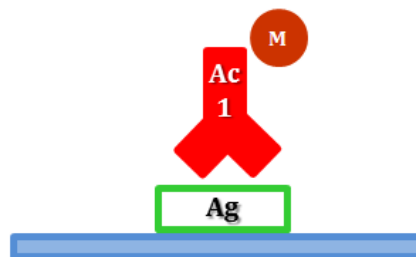


Figura 56 – Método direto

Possui como principais vantagens a simplicidade e a rapidez, e, como desvantagens, a pouca ampliação de sinal, pois somente existe uma molécula de marcador por molécula de antígeno e o facto de ser dispendioso, pois obriga à existência de anticorpos primários com marcador.

6.2 Métodos indiretos

6.2.1 Simples

Neste método são utilizados dois tipos de reagentes (Figura 57):

- A. Primário - anticorpo dirigido contra o antígeno que se quer detetar;
- B. Secundário - anticorpo dirigido contra as imunoglobulinas da espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário. Está marcado com a substância que permite a visualização do complexo.

Podem ser utilizados como anticorpos secundários, entre outros, os *Rabbit anti-mouse Igs* (RAM) no caso do anticorpo primário ser produzido em ratinho ou os *Swine anti rabbit Igs* (SAR) no caso do anticorpo primário ser produzido em coelho.

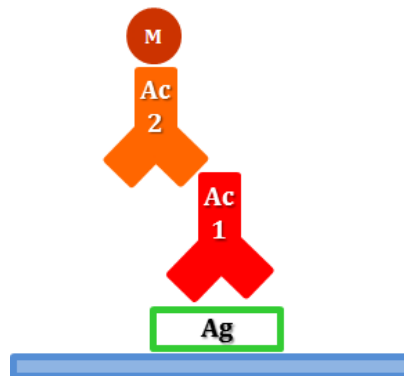


Figura 57 – Método indireto simples

Possui como principais vantagens ser mais sensível do que o método direto, pois há maior número de moléculas de marcador por cada molécula de Antígeno, possuir maior versatilidade do que o método direto, pois basta possuir um anticorpo secundário marcado e não é necessário que os primários estejam marcados, e é mais económico.

Como desvantagens assinala-se que é mais demorado e complexo do que o método direto.

6.2.2 Método Peroxidase Anti Peroxidase (PAP)

Neste método são utilizados três tipos de reagentes⁵⁴ (Figura 58):

- A. Primário - anticorpo dirigido contra o antigénio que se quer detetar;
- B. Secundário (ou de ponte) - anticorpo dirigido contra as imunoglobulinas da espécie animal em que foi produzido o anticorpo anterior;
- C. Complexo Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP).

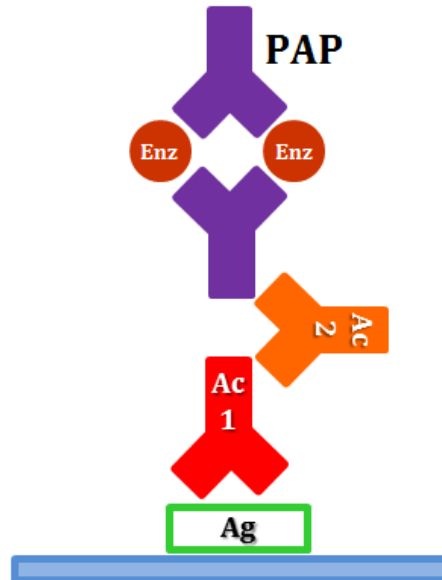


Figura 58 – Método PAP

Para que o anticorpo secundário possa fazer a ponte entre ambos, o complexo PAP deverá ser produzido na mesma espécie animal do anticorpo primário.

O anticorpo secundário deve ser aplicado em excesso de modo a manter uma porção Fab ligada ao anticorpo primário e a outra porção Fab livre para se poder ligar ao complexo PAP.

Possui, como principais vantagens, maior sensibilidade relativamente aos métodos anteriormente descritos, a não utilização de anticorpos marcados e permite o aumento das diluições do anticorpo primário e consequentemente a diminuição da marcação de inespecífica.

Como desvantagens é de assinalar que é mais demorado e complexo do que os métodos anteriores.

6.2.3 Método APAAP (Alkaline phosphatase anti Alkaline phosphatase)

Método semelhante ao PAP, mas que utiliza como marcador a fosfatase alcalina em vez da peroxidase (Figura 59).

É bastante utilizado em situações que pela sua natureza impeçam ou dificultem a utilização dos métodos de imunoperoxidase, como, por exemplo, lâminas de imunocitoquímica (amostra citológica) com muitos eritrócitos.

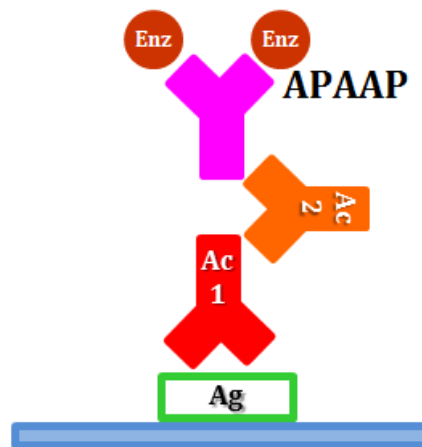


Figura 59 – Método APAAP

6.3 Métodos de avidina-biotina

6.3.1 Enquadramento histórico

Os métodos de avidina-biotina são utilizados desde a década de 40 em cromatografias bioquímicas que se baseavam na grande afinidade entre a avidina e a biotina. Só em 1977 se dá a aplicação do sistema avidina-biotina em Imunohistoquímica, por Heggeness e Ash em métodos de imunofluorescência⁵⁵. Em 1981, Hsu *et al* introduziram o Complexo Avidina-biotina (ABC), que permitiu a grande popularização destas técnicas e que ainda hoje tem alguma utilização^{56,57}. Posteriormente surgiram inovações como a utilização da streptavidina, a técnica da *Labelled Avidin-biotin* (LAB) e a técnica da *Labelled Streptavidin-biotin* (LSAB).

Todos os métodos de avidina-biotina se baseiam em 4 princípios gerais:

- A. A extraordinária afinidade existente entre a avidina e a biotina que se ligam espontaneamente formando um complexo praticamente indissociável;
- B. A possibilidade existente de ligação entre a biotina e outras moléculas, como enzimas e anticorpos (anticorpos biotinilados);
- C. Possibilidade de se marcar a avidina com uma variedade de substâncias como enzimas, metais pesados ou fluorocromos;
- D. Possibilidade de utilização da avidina como ponte entre duas moléculas biotiniladas (e.g. um anticorpo e uma enzima).

6.3.2 Principais características da avidina

Trata-se de uma glicoproteína básica com peso molecular de 67 kDa, presente na clara do ovo em grandes quantidades e que, apesar de existir em alguns ovíparos, não tem expressão nos mamíferos. É constituída por quatro subunidades, que por sua vez são constituídas cada uma, por uma cadeia polipeptídica simples de 128 aminoácidos.

A principal característica da estrutura terciária desta molécula é a formação de quatro “bolsas”, cada uma correspondente a uma das referidas subunidades (Figura 60), e que têm a capacidade de se ligar a uma molécula de biotina⁵⁸ (Figura 61).



Figura 60 – Representação esquemática da avidina com 4 bolsas



Figura 61 – Representação esquemática da avidina ligada a 4 biotinas

Apesar das suas úteis características, a avidina possui uma desvantagem que é a presença de resíduos oligossacáridos na sua estrutura⁵⁹. Estes elementos induzem a ligação da avidina a estruturas tecidulares de carga eléctrica negativa, o que provoca o aparecimento de marcação inespecífica de fundo. Para suplantar este problema implantou-se a utilização de streptavidina⁶⁰.

6.3.3 Principais características da streptavidina

A streptavidina é uma proteína de peso molecular de 60 Kd, extraída da cultura de *Streptomyces avidinii*, não possuindo resíduos oligossacáridos. Embora a avidina possua uma estrutura secundária, terciária e quaternária quase idêntica à da streptavidina, as duas proteínas mostram apenas 30% de semelhança quando sequenciadas e pensa-se que

não possuem relação evolutiva⁶¹. Se a avidina tem uma maior afinidade para a biotina não conjugada, a streptavidina possui maior afinidade para a biotina conjugada⁶².

6.3.4 Principais características da Biotina

Também conhecida por vitamina H, é uma proteína muito simples de apenas 244 d, existente em grande quantidade na gema do ovo (Figura 62). A sua simplicidade permite a sua ligação em cada uma das “bolsas”, que existem na molécula de avidina para a qual é específica.

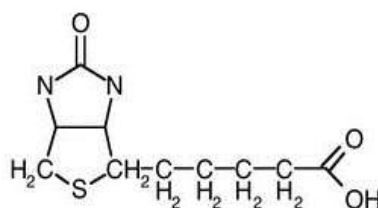


Figura 62 - Estrutura química da Biotina

Fonte: <http://www.csapt.it/b/bi/biotina.html>

6.3.5 A ligação entre a avidina e a biotina

A ligação entre a avidina e a biotina é devida a ligações químicas não covalentes e é extremamente rápida e forte, sendo uma das ligações mais duradouras das existentes na Natureza⁶³. Só pode ser quebrada em situações extremas como a utilização de um meio de pH extremamente baixo (1.5)⁶⁴.

6.3.6 Biotinilação

Processo pelo qual a biotina é conjugada com uma variedade de moléculas por exemplo: enzimas, ácidos nucleicos ou anticorpos. O pequeno tamanho da molécula de biotina permite a ligação às referidas estruturas sem que ocorram alterações ao nível das suas características imunológicas ou físicas⁶⁵. Pode até ser efetuada a múltipla biotinilação do mesmo anticorpo sem que surjam alterações imunológicas. Surge-nos assim a possibilidade de “revestir” um anticorpo ou uma enzima com um grande número de moléculas de biotina, que se comportam como locais de ligação para a avidina. O número máximo de moléculas de biotina que se podem ligar a um anticorpo foi estimado em 150.

O processo de biotinilação implica a passagem da biotina para a sua forma ativada permitindo assim a sua ligação através do grupo carboxílico às zonas NH₂ da molécula a ser

biotinilada. A biotilação não é somente aplicada a anticorpos, mas também a Ácidos nucleicos para utilização em ISH (*in situ hybridization*).

6.3.1 Bloqueio da biotina endógena

A biotina existe normalmente em alguns órgãos humanos, sendo neste caso denominada endógena. Para evitar que esta molécula se ligue à avidina utilizada na imunohistoquímica, criando falsos positivos ou fundo inespecífico, pode ser feita um bloqueio da biotina endógena, que consiste na aplicação, no início da imunohistoquímica, de avidina livre que se irá ligar à biotina endógena, bloqueando-a. Seguidamente é aplicada biotina livre para bloqueio dos pontos ativos livres da avidina previamente aplicada. Logo, no local onde havia uma molécula de biotina passa a existir um complexo de avidina-biotina completamente desativado (Figura 63).

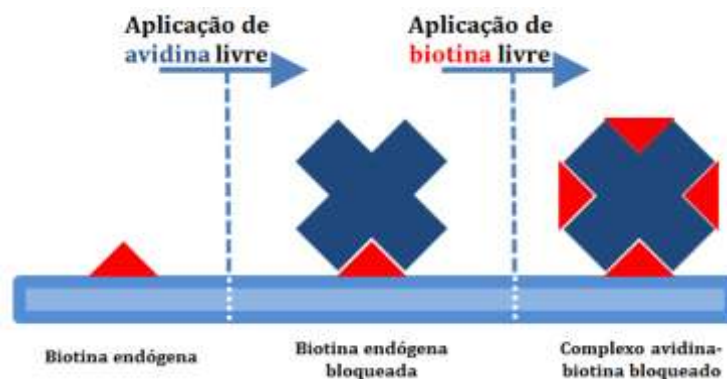


Figura 63 – Bloqueio da biotina endógena.

6.3.2 Marcação da avidina

A avidina pode ser marcada com diversas moléculas, como por exemplo:

- A. Fluorocromos: FITC ou TRITC;
- B. Enzimas: HRP, fosfatase alcalina, beta- galactosidase;
- C. Ferritina ou ouro coloidal.

No caso dos fluorocromos, pode existir ligação via um derivado do isotiocianato. Para as enzimas e a ferritina é utilizado um reagente de braço duplo como o glutaraldeído; finalmente o ouro coloidal liga-se através de forças eletrostáticas não covalentes.

6.3.3 Técnicas imunohistoquímicas de avidina-biotina

As técnicas que utilizam a avidina e a biotina não diferem, no seu essencial, das outras. Logo não é necessária a utilização de processamento ou fixação especial, o que permite a

sua aplicação na rotina hospitalar. As técnicas mais conhecidas são a *streptavidin-biotin complex* (streptABC) e a *labelled streptavidin-biotin* (LSAB).

As suas principais vantagens são:

- A. Alta sensibilidade: a possibilidade de biotinylação de um anticorpo com cerca de 150 moléculas de biotina permite uma ampliação de sinal, que as técnicas usadas anteriormente não atingiam;
- A. Alta versatilidade: a alta polivalência do processo de biotinylação permite a utilização das técnicas de avidina-biotina em diversas situações como a imunohistoquímica, Hibridação *in situ* ou a citoquímica de afinidade, quer em microscopia electrónica quer em microscopia ótica.

As suas desvantagens são:

- A. Ligação da avidina a estruturas tecidulares carregadas negativamente. Esta desvantagem foi suplantada com a introdução da streptavidina;
- B. Ligação da avidina e streptavidina à biotina endógena que existe normalmente em alguns órgãos humanos como o rim, o fígado ou a mama.

6.3.3.1 Técnica streptABC

Nesta metodologia são utilizados 3 passos (Figura 64):

- A. Aplicação do anticorpo primário dirigido contra o antigénio pretendido;
- B. Aplicação do anticorpo secundário biotinilado dirigido contra o anticorpo primário;
- C. Aplicação do complexo streptavidina-biotina (marcado com substância propiciadora da visualização - normalmente HRP).

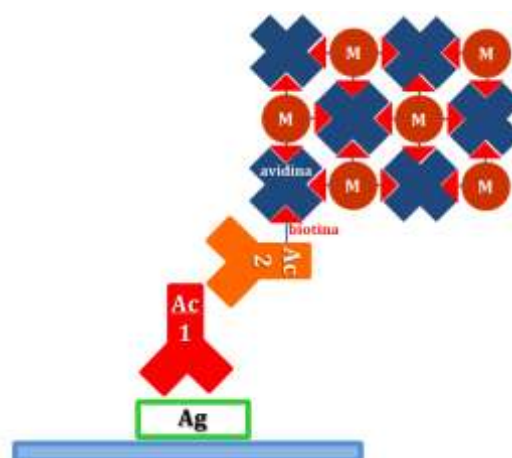


Figura 64 – Método streptABC

A preparação do complexo streptABC é feita cerca de 1 a 4h antes da aplicação. Mistura-se streptavidina e biotina marcada com HRP de modo a que haja ligação entre elas. As proporções adicionadas devem facultar a existência de uma zona livre na streptavidina e três ocupadas com biotina marcada.

6.3.3.2 Técnica LSAB

Nesta metodologia são utilizados 3 passos (Figura 65):

- A. Aplicação do anticorpo primário contra o antígeno pretendido;
- B. Aplicação do anticorpo secundário biotilado dirigido contra o anticorpo primário;
- C. Aplicação da streptavidina marcada com substância propiciadora da visualização (normalmente HRP).

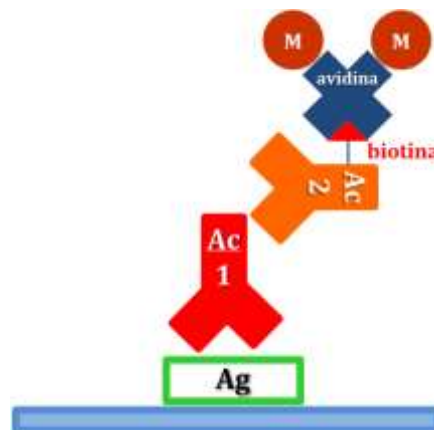


Figura 65 – Método LSAB/LAB

6.3.4 Aplicações práticas

Os métodos que utilizam a avidina-biotina, sendo bastante sensíveis, são úteis para a detecção de pequenas quantidades de antígeno. Estas pequenas quantidades podem existir normalmente ou como consequência da fixação e processamento. Também devido à alta sensibilidade, estes métodos permitem a diminuição do “fundo” por aumento da diluição dos anticorpos primários, o que também diminui os custos. No entanto, a alta sensibilidade pode ter consequências negativas como a ampliação do sinal de pequenas quantidades de biotina endógena ou a ampliação de sinal de pequena quantidade de anticorpo primário ligado inespecificamente. Para além disso, estes métodos facultam uma diminuição dos tempos de incubação, tornando a técnica mais rápida.

As técnicas que utilizam a avidina marcada foram muito populares durante vários anos, mas estão atualmente em forte decréscimo devido à introdução dos métodos de polímero.

6.4 Métodos de polímero

Fruto de uma evolução constante que gerou várias patentes registadas⁶⁶⁻⁶⁸, estão, atualmente, em uso os sistemas de amplificação de polímero que permitem novas abordagens dos conceitos anteriormente utilizados. Os métodos que maior sucesso obtiveram foram os métodos de polímero, que podem ser de esqueleto interno ou de micropolímeros de enzimas.

Tendo em conta que, através da utilização dos polímeros, existe a possibilidade de conjugar grandes quantidades de marcador a anticorpos, emerge uma capacidade superior de amplificação, pois conseguem concentrar bastantes moléculas propiciadoras de visualização, normalmente enzimas, por molécula de antigénio. Como está presente um grande número de enzimas no polímero, maior quantidade de cromogénio será precipitada, o que resulta numa marcação mais intensa e brilhante, aumentando assim a sensibilidade do método, permitindo detetar até as quantidades mais ínfimas de antigénio⁶⁹.

Além disso, estes métodos permitem diminuir os custos com anticorpos primários pois facultam um aumento das suas diluições de trabalho sem comprometer a intensidade das marcações. Com maiores diluições de trabalho dos anticorpos primários surgem também outras vantagens, como a forte diminuição das marcações inespecíficas provocadas pelas marcações cruzadas. O facto destes sistemas não possuírem (strept)avidina nem biotina torna desnecessária a utilização de reagentes bloqueadores⁷⁰. Paralelamente permitem ainda a utilização de recuperação antigénica mais vigorosa sem o receio de evidenciar biotina endógena⁷¹. Os sistemas de polímero possibilitam todas estas vantagens enquanto se beneficia da simplicidade e rapidez de um ensaio de poucas etapas⁶⁹.

Na generalidade, os métodos são simples e de rápida execução, tornando menos provável a variabilidade intra-laboratorial, aumentando a reprodutibilidade e a facilidade de padronização, e diminuindo fatores de erro, equívocos e repetições. Para reforçar esta tendência os reagentes são normalmente fornecidos pelo fabricante em formato líquido, pronto a aplicar, com proteína estabilizadora e conservante. Estas características aumentam a qualidade e garantem a diminuição dos custos do trabalho e do tempo técnico

e, quando associadas à possibilidade de aumentar diluições dos anticorpos primários, permitem compensar largamente os custos destes reagentes⁶⁹.

De um ponto de vista muito prático, estes métodos são extremamente úteis, particularmente quando são necessários resultados muito rápidos. Podem, por exemplo, ser aplicados rotineiramente para avaliar, em exame intra-operatório, as margens cirúrgicas de um melanoma através de cirurgia micrográfica de Mohs, detetando melanócitos por via do antigénio *MART-1/Melan A*. Com este método rápido e sensível surgem benefícios para o doente e para as equipas de cirurgia e patologia, garantindo margens cirúrgicas mais seguras, com todas as consequências que daí advém em mortalidade, morbilidade e qualidade de vida⁷².

6.4.1 Polímero de esqueleto interno

Como o próprio nome indica estas metodologias recorrem a uma macromolécula constituída por um esqueleto central de grandes dimensões, ao qual estão acopladas grandes quantidades de anticorpos e moléculas propiciadoras da visualização que podem ser enzimas (Figura 66).

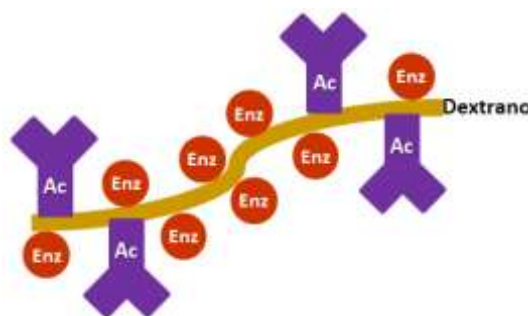


Figura 66 – Polímero de esqueleto interno

As principais moléculas utilizadas como esqueleto interno são os dextransos. Estes polisacarídeos hidrofílicos são caracterizados pelo seu elevado peso molecular de aproximadamente 500 kDa, alta hidrosolubilidade e baixa toxicidade/imunogenicidade. São bioquimicamente inertes, devido à sua rara ligação poli-(α -D-1,6-glucose) que os torna resistentes à clivagem pela glucosidases endógenas celulares⁷³.

O dextrano é comercializado sob a forma de aglomerados poliméricos extremamente flexíveis, que em solução se transformam em espirais muito expansíveis. Este composto é facilmente solúvel em água e eletrólitos, constituindo soluções incolores, transparentes e altamente estáveis. O pH não afeta significativamente a sua solubilidade e é possível dissolvê-lo em sulfeto de metilo, formamida, etilenoglicol e glicerol. No entanto, é

insolúvel em metanol, etanol, isopropanol, acetona e 2-propanona. As soluções de dextrano podem ser esterilizadas em autoclave e são estáveis por muitos anos, devendo ser conservadas a temperatura constante. O pH ideal para o armazenamento é entre 6.0 e 7.0, no entanto, o dextrano é estável à temperatura ambiente por longos períodos na faixa de pH 4-10. Em aplicação farmacêutica este composto é utilizado em várias preparações parentéricas, é um ingrediente de soluções para uso oftálmico e também é usado em cremes e pomadas⁷³.

Os dextranos são formados a partir da sacarose durante o crescimento de bactérias pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, todas pertencentes à família *Lactobacillacea*. No entanto, a maioria dos dextranos é sintetizada pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*⁷³.

A biodegradação do dextrano é realizada por enzimas (dextranases) produzidas por alguns fungos como *Penicillium* e *Verticillium*. Os produtos de degradação são essencialmente açúcares de baixo peso molecular, por exemplo glicose ou isomaltose. Da mesma forma, muitas bactérias produzem dextranases extracelulares que degradam o dextrano em açúcares de baixo peso molecular: *Lactobacillus*, *Cellvibrio*, *Cytophaga* e *Bacillus spp*^{74,75} (Figura 67).



Figura 67 - Dextrano (esquerda - estrutura química; centro - aspecto físico; direita - *Leuconostoc mesenteroides*)

Fontes: <http://www.enterprise-europe-network.ec.europa.eu/src/request/pictures/Structure%20dextrane.gif>;
<http://www.dextran.net/dextrans-image-gallery.html>; <http://genome.jgi.doe.gov/leume/leume.home.html>

Este tipo de polímero atinge grandes dimensões e engloba cerca de 100 moléculas de HRP e até 20 anticorpos secundários do tipo cabra antiratinho ou cabra anticoelho. Todas estas moléculas estão ligadas diretamente ao esqueleto de dextrano ativado⁶⁹.

6.4.1.1 Polímero de esqueleto interno direto

Neste método utiliza-se somente um polímero que é constituído pelo esqueleto de dextrano ao qual estão acoplados anticorpos “primários” e substâncias propiciadoras da visualização – normalmente HRP (Figura 68).

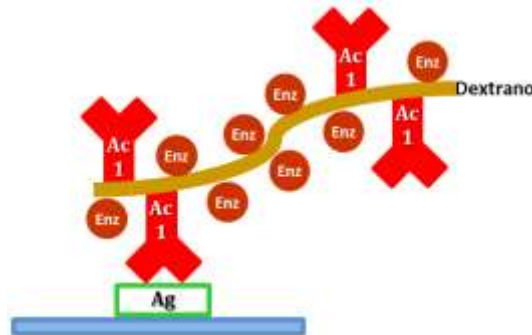


Figura 68 – Polímero de esqueleto interno direto

Por possuir só um passo, trata-se de um método extremamente rápido e fácil, evidenciando uma diminuição de fatores de erro. No entanto, possui pouco poder de amplificação. Para além disso, é relativamente dispendioso e existem poucos anticorpos primários comercializados desta forma.

O principal polímero deste tipo a ser comercializado foi o Enhanced Polymer One-Step Staining (EPOS™), da Dako, apresentado por Bisgaard *et al* e introduzido no mercado em 1993⁷⁶.

6.4.1.2 Polímero de esqueleto interno indireto

Neste método aplica-se um anticorpo primário dirigido contra o antígeno pretendido e posteriormente aplica-se um polímero ao qual estão acoplados anticorpos “secundários” e substâncias propiciadoras da visualização – normalmente HRP (Figura 69).

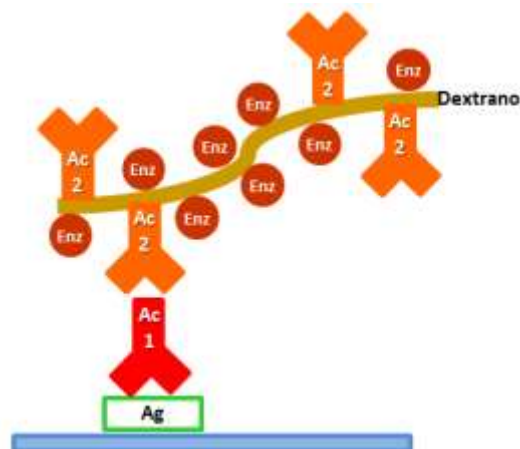


Figura 69 – Polímero de esqueleto interno indireto

Por possuir só dois passos, trata-se de um método rápido e fácil, evidenciando uma diminuição de fatores de erro. Para além disso é um método muito ampliativo, deslocando bastantes moléculas propiciadoras de visualização por molécula de antigénio. É, no entanto, relativamente dispendioso.

6.4.2 Micropolímeros de enzimas

A utilização dos polímeros aumenta drasticamente o número de enzimas que podem ser conjugadas com anticorpos. No entanto, no início da sua comercialização, com os polímeros de esqueleto interno, esses produtos conjugados possuíam um tamanho muito elevado e a densidade de enzima por unidade de superfície não assumia uma proporção eficiente para esse tamanho. Tendo em conta esta característica, conceptualizou-se que seria desejável obter um complexo anticorpo-enzima mais compacto, com um elevado número de moléculas de enzima ligado a cada anticorpo, mas garantindo um aumento mínimo de tamanho molecular⁷⁷.

De forma a alcançar este objetivo, fizeram-se algumas experiências que procuravam combinar pequenas moléculas de estrutura linear ou minimamente ramificada, de forma a polimerizar anticorpos e enzimas, constituindo um complexo muito compacto. Observou-se então que a polimerização de pequenas moléculas orgânicas monoméricas pode ser realizada com recurso ao ácido acrílico e ao ácido bisacrílico. Assim, utilizaram-se estes reagentes de forma a criar um complexo de elevado nível de polimerização que não perde o seu poder de reação e penetrabilidade pois o rácio de polimerização, apesar de elevado, não se torna inoportável, pois é condicionado pelo facto da HRP apenas possuir um grupo amino que é facilmente acessível⁷⁷.

Ao contrário dos sistemas de polímero de esqueleto interno, que utilizam moléculas de dextrano com configuração molecular extensa, os micropolímeros de enzimas apostam no pequeno porte e na elevada concentração funcional. Embora o produto final desta conjugação por via do ácido acrílico e dos seus derivados, seja um complexo heterogéneo, com diferentes tamanhos moleculares, formas e rácios enzima/anticorpo, a experiência prática sugere que o conhecimento da relação exata entre anticorpo e enzima, da forma molecular ou do tamanho não é fundamental para avaliar o seu desempenho. Os resultados dos estudos indicam que a imunomarcagem proporcionada por estes reagentes é de elevada qualidade, independentemente dos antigénios serem de membrana, citoplasma ou núcleo^{77,78}.

Segundo os seus fabricantes esta abordagem evita os problemas decorrentes do uso de dextrano ou de outras macromoléculas como esqueleto. O micropolímero com uma alta densidade de enzima muito ativa acoplada a um anticorpo secundário gera um reagente, que supera a interferência estérica que advém do enorme volume ocupado pelo polímero de esqueleto interno. Este método proporciona maior acessibilidade ao antigénio pois a pequena dimensão dos seus reagentes permite uma melhor difusão aos pontos-alvo e uma redução da ligação não específica^{79,80} (Figura 70).

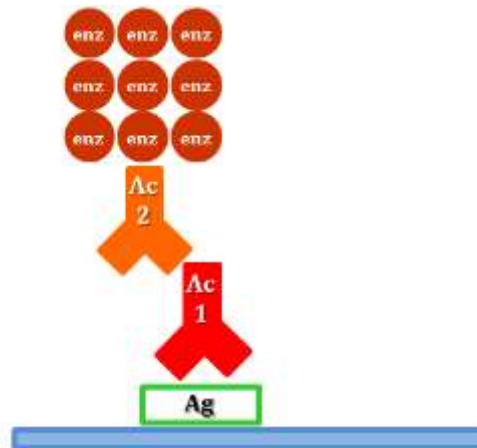


Figura 70 - Micropolímero de enzimas indireto.

6.4.3 Sistemas de dois e três passos

Os sistemas de polímero, atualmente os mais difundidos, podem possuir só dois passos, ou seja implicar apenas a incubação do anticorpo primário e, posteriormente, do polímero propriamente dito. No entanto, para a deteção de alguns antigénios verificou-se que a intensidade de imunomarcacão ficava diminuída e assumiu-se que isso era devido a problemas de penetração do polímero nos tecidos, provavelmente em resultado de impedimento espacial provocado pelo elevado peso molecular dos grandes conjugados poliméricos⁷⁸. Para tentar ultrapassar este problema foram criados os sistemas de três passos, nos quais é incluída a aplicação de um anticorpo extra (comumente designado pelos fabricantes como ativador), entre o primário e o polímero, que aumenta a capacidade de deteção do sistema e a sua sensibilidade⁷⁰. Este segundo anticorpo permitirá o aumento da superfície de ligação disponível para o polímero que é colocado *a posteriori* (Figura 71).

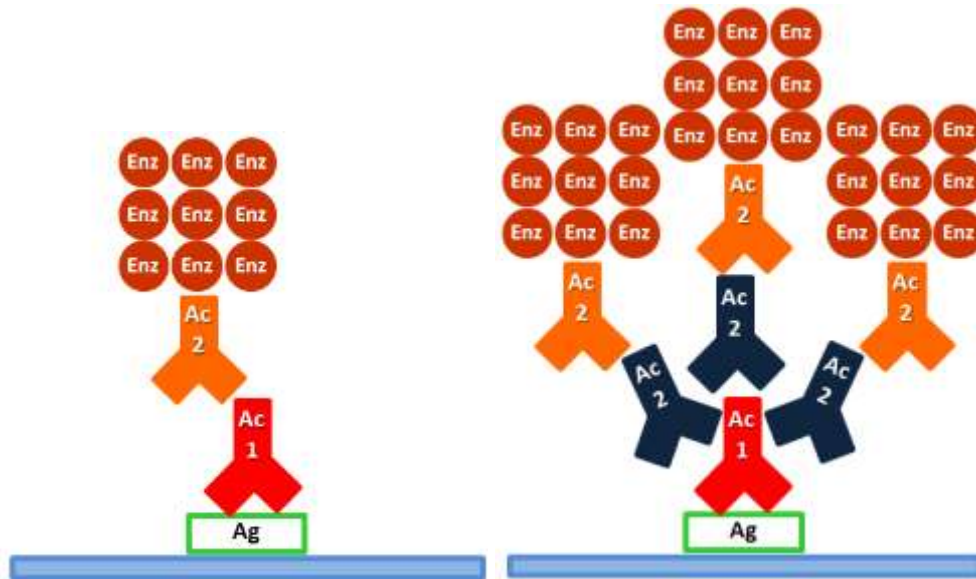


Figura 71 - A colocação do segundo anticorpo permite aumentar a quantidade de polímeros ligados

Além disso, este anticorpo permitirá aumentar, em dimensão tridimensional, todo o complexo que está ligado ao tecido, facilitando assim a ligação do polímero nas situações em que o antígeno se encontra na profundidade tridimensional do tecido (Figura 72).

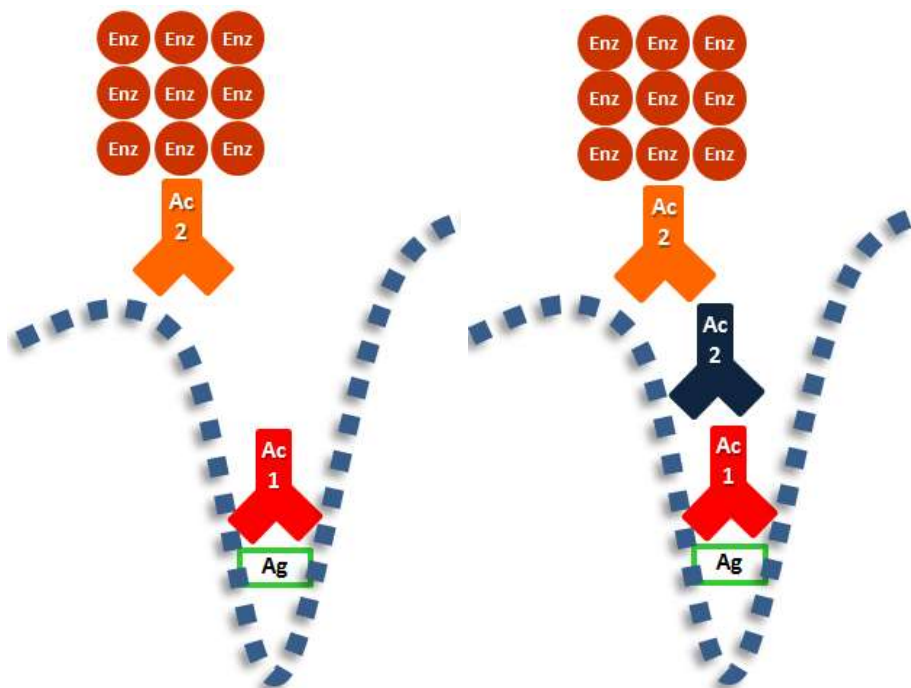


Figura 72 - A colocação do segundo anticorpo permite associar o polímero ao antígeno

7 ASPETOS PRÁTICOS DOS MÉTODOS

Uma das principais estratégias para o sucesso dos métodos imunohistoquímicos passa pela aplicação rigorosa de todos os procedimentos, incluindo uma planificação cuidada e devidamente registada. Outra das estratégias implica a utilização de reagentes de elevada qualidade devidamente validados, incluindo a efectiva verificação dos limites de validade.

Nunca se deve realizar a técnica sem o devido controlo de qualidade, positivo e negativo, de modo a garantir a fidelidade dos resultados.

Todas as técnicas devem ser aplicadas e/ou controladas por profissionais com formação e experiência em imunohistoquímica de modo a garantir a sua eficiência e adequado *troubleshooting*.

7.1 Cuidados com material e reagentes

Existem diversos procedimentos a assegurar na execução de técnicas imunohistoquímicas, sendo que um dos principais se prende com a correcta utilização do material e reagentes. Todo o material a utilizar deve encontrar-se devidamente limpo, de forma a evitar contaminações ou danos na técnica, e aquele que é descartável deve ser cuidadosamente separado após utilização.

Os reagentes habitualmente utilizados nas baterias de hidratação/desidratação, como etanol, xilol ou água destilada devem ser mudados dos recipientes com relativa frequência, de forma a manter o maior grau de pureza possível.

Ao utilizar pipetas de Pasteur, estas devem ser descartadas num recipiente apropriado após cada utilização, bem como as pontas das micropipetas.

7.2 Diluição de soros de anticorpos

Existem no mercado diversos soros sob a forma pré-diluída que permitem aplicação imediata, mas a margem de manobra que facultam é limitada (Figura 73). A maior parte dos anticorpos são comercializados sob a forma concentrada e é necessário proceder à sua diluição para posterior aplicação. A apresentação concentrada dos anticorpos é a ideal para a adaptação personalizada de cada laboratório com as suas características pré-analíticas específicas, sendo assim possível contor-

nar condições de fixação e de processamento que, por vezes, se encontram longe das ideais.



Figura 73 – Soros pré-diluídos

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

[rad.com/webroot/web/images/cdg/products/autoimmune/product_detail/global/aibu_29403_pdp.jpg](http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/cdg/products/autoimmune/product_detail/global/aibu_29403_pdp.jpg)

7.3 A diluição ideal

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

É necessário efectuar alguns cálculos quando se pretende calcular as quantidades de soro a pipetar. Existe ainda a possibilidade de conjugar a diluição do anticorpo com outros factores que podem ser manipulados de modo a melhorar e adaptar à técnica as condições de cada laboratório:

- A. Método utilizado;
- B. Tempo de incubação;
- C. Temperatura de incubação.

7.4 Teste de diluição de soros de anticorpos

Caso o fabricante forneça uma indicação de partida para a diluição ideal do anticorpo, esta deverá ser utilizada como ponto de partida para o teste. Se isso não acontecer, deverá ser utilizado o teste padrão do laboratório para os anticorpos, cuja diluição é desconhecida. Exemplo: 1/20; 1/50; 1/100; 1/200; 1/500.

A diluição correcta de um anticorpo é o factor que mais contribui para a qualidade de uma lâmina de imunohistoquímica.

A maneira mais utilizada para o teste de anticorpos é a utilização de um método sensível, um tempo e uma temperatura de incubação constantes, fazendo variar as diluições de forma programada até se identificar a diluição ideal.

7.5 Pipetagem

Os soros utilizados em imunohistoquímica são utilizados normalmente em quantidades muito reduzidas da ordem dos microlitros. O microlitro é a unidade de volume equivalente à milionésima parte de um litro, representada pelo símbolo μL e equivalente ao milímetro cúbico (mm^3).

Para manusear pequenas quantidades de reagente de forma precisa, utilizam-se micropipetas, que medem um volume exacto e facilmente aspiram e expelem líquidos. Ao utilizar a micropipeta, deve escolher-se a ponta adequada, normalmente reconhecida pela cor presente no topo da micropipeta. Por regra, utiliza-se o polegar para controlar cuidadosamente o êmbolo da micropipeta, pois este é, para a maioria dos indivíduos, o dedo com melhor motricidade fina.

7.5.1 Cuidados gerais

Selecione o volume a pipetar dentro da amplitude da micropipeta. Não tente seleccionar um volume que ultrapasse o mínimo ou o máximo permitido.

Quando utilizar a micropipeta colocar sempre primeiro a ponta. Se não proceder desta forma poderá aspirar líquido para dentro da câmara e provocar danos graves⁸¹ (Figura 74).

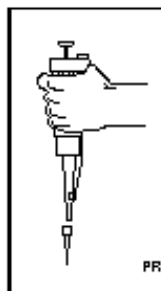


Figura 74 – Colocação de ponta na micropipeta

Fonte: <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/geneconn/smallvol/part1.php>

Mantenha sempre a micropipeta numa posição vertical quando tem líquido na ponta. Não permita que o líquido possa escorrer para o seu interior⁸¹ (Figura 75).

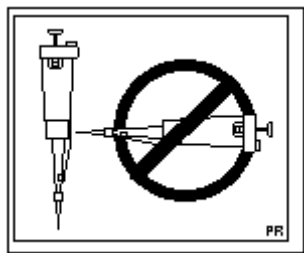


Figura 75 - Colocação da micropipeta

Fonte: <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/geneconn/smallvol/part1.php>

Mude sempre de ponta a cada pipetagem. Utilize o seu polegar para controlar a velocidade a que aspira ou dispensa o líquido. Se for demasiado brusco pode aspirar líquido para dentro da câmara da micropipeta⁸¹ (Figura 74).

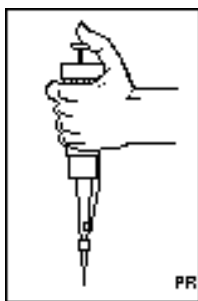


Figura 76 - Utilização do polegar para pipetar

Fonte: <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/geneconn/smallvol/part1.php>

7.5.2 Preparação da Micropipeta

Verifique se possui a micropipeta correcta para pipetar a quantidade desejada. No caso de micropipetas de volume variável existem três amplitudes mais comuns: 1-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L. Ao regular o volume desejado tenha sempre presentes as características mecânicas da micropipeta. Pressione a extremidade da micropipeta na ponta adequada. As pontas amarelas são para 1-200 μ L. As pontas azuis são para 100-1000 μ L⁸¹.

7.5.3 Como retirar uma amostra com uma micropipeta

Antes de pegar na micropipeta destape o tubo ou frasco de onde vai retirar a amostra. Segure a micropipeta na posição vertical numa mão e o tubo na outra mão. Ambos deverão estar ao nível dos olhos⁸¹ (Figura 77).

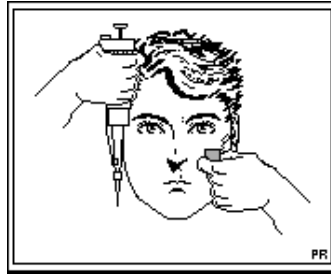


Figura 77 – Micropipeta e tubo ao nível dos olhos

Fonte: <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/geneconn/smallvol/part1.php>

Antes de colocar a ponta dentro do líquido pressione o êmbolo da micropipeta até sentir a primeira pressão e mantenha essa posição. Não ultrapasse a primeira pressão ou irá pipetar um volume incorrecto⁸¹ (Figura 78).

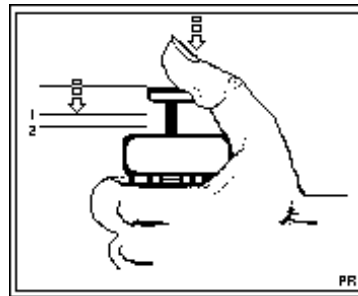


Figura 78 – Pressão no êmbolo da micropipeta

Fonte: <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/geneconn/smallvol/part1.php>

Introduza a ponta no líquido a pipetar⁸¹ (Figura 79).

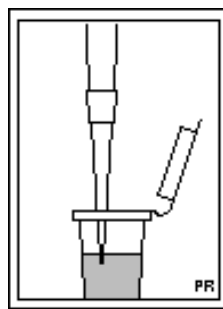


Figura 79 – Introdução da ponta no líquido

Fonte: <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/geneconn/smallvol/part1.php>

Aspire o líquido libertando lentamente o êmbolo da micropipeta. Em seguida tape o tubo ou frasco que contem o líquido a pipetar⁸¹ (Figura 80).

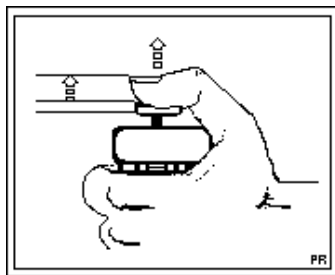


Figura 80 – Libertar o êmbolo da micropipeta

Fonte: <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/geneconn/smallvol/part1.php>

7.5.4 Como expelir a amostra da micropipeta

Com a mão livre destape o tubo ou frasco para onde pretender colocar o líquido pipetado. Segure a micropipeta numa posição vertical com uma mão e segure o tubo ou frasco de destino com a outra. Ambos deverão estar ao nível dos olhos.

Toque a parede interior do tubo ou frasco de destino com a ponta. Isto cria uma pequena tensão superficial que auxilia à expulsão do líquido da ponta da micropipeta⁸¹ (Figura 81).

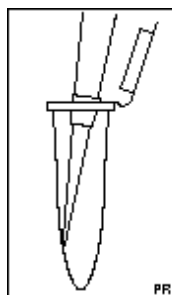


Figura 81 – Ponta a tocar parede do tubo

Fonte: <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/geneconn/smallvol/part1.php>

Lentamente pressione o êmbolo da micropipeta até à primeira pressão. Depois continue até à segunda pressão e mantenha o êmbolo nessa posição⁸¹ (Figura 82).

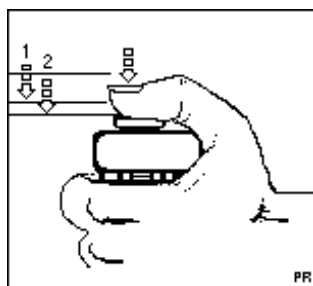


Figura 82 – Pressão no êmbolo da micropipeta

Fonte: <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/geneconn/smallvol/part1.php>

Lentamente retire a micropipeta do tubo ou frasco, mantendo o êmbolo pressionado e evitando aspirar líquido para dentro da ponta⁸¹.

7.6 Duração da incubação

Normalmente estabelece-se um tempo de incubação uniforme para todos os soros. Esse é o ponto de partida e só é alterado caso se prove ser inaplicável.

Tempos mais utilizados:

- 30 minutos (o mais utilizado).
- 60 minutos.
- 16 horas (incubação *overnight*).

De um modo geral, quanto maior o tempo de incubação, maior a intensidade de marcação específica e conseqüentemente de marcação inespecífica e de fundo.

7.7 Temperatura de incubação

É estabelecida no início dos testes, e só é alterada caso se prove inaplicável por maus resultados.

Temperaturas mais utilizadas:

- A. 4°C;
- B. 37°C;
- C. Temperatura ambiente (a mais utilizada).

De um modo geral, quanto maior a temperatura, maior a marcação e conseqüentemente maior a marcação de fundo.

7.8 pH

É estabelecido no início dos testes e assim permanece até final com o auxílio da solução tampão. O intervalo de valores de pH mais utilizado vai de 7.4 a 7.6.

7.9 Higiene e segurança no Laboratório

Ao trabalhar dentro de qualquer laboratório, é importante ter presente regras de segurança indispensáveis a uma boa prática. Cada indivíduo tem o dever de tomar os procedimentos adequados à salvaguarda da saúde e segurança tanto suas como daqueles que o rodeiam.

O uso de substâncias tóxicas, corrosivas, inflamáveis ou explosivas, de alta temperatura ou electricidade potenciam os riscos. Por isso, devem cumprir-se as regras básicas de segurança:

- A. Conservar as bancadas arrumadas e limpas,
- B. Não correr ou fazer movimentos bruscos,
- C. Lavar as mãos com frequência,
- D. Não pipetar com a boca,
- E. Fazer a correcta manipulação de reagentes,
- F. Adicionar soluções concentradas sobre outras mais diluídas e não o inverso.

É também indispensável o uso de equipamentos de protecção individual, como bata, luvas, óculos, máscara e outros, sempre que a situação o justifique. A protecção colectiva representa um importante factor de segurança e é conseguida com adequados sistemas de ventilação e extracção de ar, entre outros.

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

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

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

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

8 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

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

8.1 Fixação em Imunohistoquímica

A fixação é uma das mais importantes fases da preparação da amostra, sabendo-se que a sua principal finalidade é manter as células e os tecidos o mais próximo possível das características *in vivo*⁵⁰, assegurando^{14,82}:

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

O formaldeído tem sido o fixador mais utilizado nos laboratórios de Anatomia Patológica, pois é bastante económico e possui grande poder de penetração nos tecidos, preservando os detalhes morfológicos com artefactos de retração reduzidos¹⁴. No entanto, este químico provoca algumas alterações estruturais nas biomoléculas, principalmente nas proteínas, que, por sua vez, constituem o principal alvo das identificações imunohistoquímicas.

8.1.1 Fixação para cortes de crióstato

Os cortes de crióstato (Figura 83), pelo menos teoricamente, permitem uma maior preservação dos antígenos do que os de parafina, mas perdem no pormenor estrutural. As técnicas de Imunohistoquímica podem ser realizadas sem qualquer fixação química ou, posteriormente, podem ser utilizados diversos fixadores para os cortes de crióstato, como álcool, acetona ou até formol. Cada laboratório deve determinar o processo de fixação que considera melhor para si.



Figura 83 – Crióstato para corte de material congelado

Fonte: <http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8054/Labs/Lab2/IMAGES/cryostat.jpg>

8.1.2 Fixação em Imunohistoquímica de rotina

A maior parte dos cortes de imunohistoquímica são cortes de tecidos incluídos em parafina (Figura 84), tendo surgido várias técnicas para a fixação inicial.



Figura 84 – Microtomo para cortes de parafina

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

8.1.2.1 Formaldeído

Quimicamente, o formaldeído é o mais simples dos aldeídos e tem a denominação da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) de metanal. Possui a fórmula química H_2CO e apresenta-se, em condições normais de pressão e temperatura, como um gás incolor de cheiro característico e penetrante, sendo tóxico e carcinogénico humano documentado⁸³. É normalmente comercializado sob a forma de gás a 37%-39% em solução aquosa, a que se dá o nome de formol ou formalina. Na utilização em Anatomia Patológica o fixador mais utilizado é o formol a 10% que deve ser tamponado para manter o pH estável¹⁴.

Ao nível celular o formaldeído parece possuir a capacidade de fomentar o estabelecimento de pontes de metileno entre os aminoácidos de várias proteínas, alterando a sua forma e contribuindo para a sua inativação funcional - Figura 85.

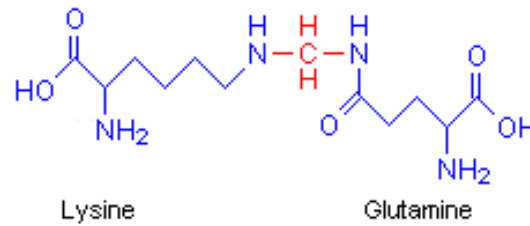


Figura 85 - Ponte de metileno entre aminoácidos.

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

O formaldeído fomenta assim alterações na conformação das proteínas que resultam na inativação das enzimas, sabendo-se que os compostos resultantes dos processos de fixação diferem dos compostos iniciais nos aspetos químicos e estruturais, e conseqüentemente nas características dos antígenos teciduais. Por conseguinte, pode dizer-se que, apesar de ser um passo indispensável na técnica histológica, a fixação afeta diretamente a imunohistoquímica, podendo “mascarar” alguns antígenos e impedir o seu reconhecimento pelo anticorpo⁵.

O formaldeído pode reagir com um epítipo antigénico mascarando-o diretamente ou pode também reagir com os aminoácidos envolventes do epítipo alterando a sua forma e mascarando-o indiretamente⁵⁰- Figura 86.

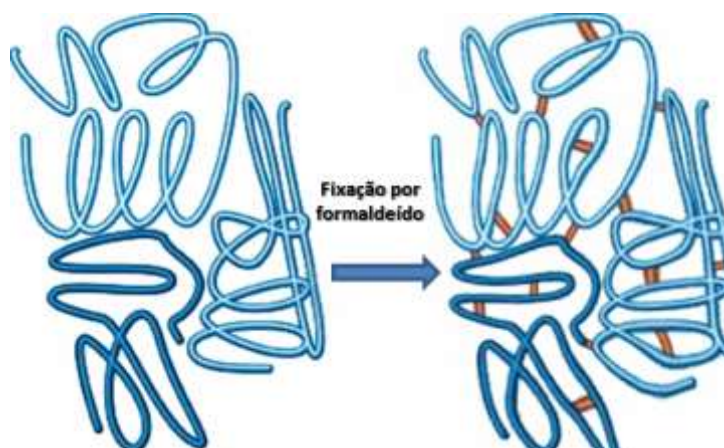


Figura 86 - Alteração estrutural em proteínas fixadas por formaldeído.

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

Estudando uma outra via, Shi e seus colaboradores sustentam a hipótese de que a sensibilidade de alguns epítomos não é devida somente ao efeito direto do aldeído mas sim à ligação de outros elementos ao epítomo, como, por exemplo, iões metálicos de que é exemplo habitual o cálcio - Ca^{2+} ⁸⁴.

Apesar de tudo, estas alterações podem, em boa medida, ser revertidas através do aquecimento dos cortes histológicos a alta temperatura em soluções específicas. Este procedimento denomina-se recuperação antigénica (*antigen retrieval*)⁸⁵. Segundo Werner, Von Wasielewski e Komminoth⁶.

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

Apesar de causar efeitos adversos, o formaldeído continua a ser o fixador mais utilizado em histopatologia por fornecer uma boa preservação morfológica e ser menos dispendioso que outros fixadores alternativos⁶⁹. Acresce ainda que, devido ao longo historial do uso deste químico, foi com recurso aos tecidos por si fixados que foi estabelecida a maior parte dos critérios em uso para diagnóstico, prognóstico e indicação terapêutica⁶⁹.

Em última análise importa ainda referir que, apesar dos epítomos ocultados pelo formaldeído poderem ser recuperados através de métodos diversos, o sistema de amplificação de imunohistoquímica deverá sempre ser sensível e específico o suficiente para dar um sinal forte e inequívoco⁷.

Os efeitos negativos causados pelo formol podem ser minimizados com a aplicação das condições ideais de fixação, pois a capacidade de afectar os antigénios não depende somente do fixador utilizado mas também das condições da fixação, como o tempo de espera entre colheita de material e fixação, pH, temperatura, tamanho dos fragmentos a fixar (o ideal seria 10*10*3 mm), duração da fixação, entre outros⁵⁰.

8.2 Processamento histológico

Se o fragmento estiver corretamente fixado, um processamento histológico consistindo em desidratação, diafanização e impregnação de parâmetros normais não terá grande impacto na qualidade antigénica dos tecidos. No entanto, podem surgir

alterações ao nível dos antígenos, principalmente devido ao aquecimento do tecido na impregnação e inclusão⁵.

Normalmente, os referidos passos do processamento histológico são realizados com recurso a um equipamento próprio, denominado processador de tecidos (Figura 87).



Figura 87 – Processador automático de tecidos

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

8.3 Preparação de lâminas

Quando sujeitas às lavagens da técnica de imunohistoquímica e à recuperação antigénica, os cortes podem descolar da lâmina, perdendo-se assim trabalho e tempo, por vezes essencial ao doente⁸⁶. Isto implica que, por regra, as lâminas de vidro utilizadas em imunohistoquímica são sujeitas a um tratamento prévio que permite um aumento da força de ligação com os cortes.

Tendo em conta que a carga elétrica dos tecidos é maioritariamente negativa (ADN, grupos fosfato, iões monovalentes, entre outros), ao fornecer às lâminas uma carga oposta (positiva) torna-se mais fácil o estabelecimento de ligações entre o tecido e a sílica do vidro da lâmina⁵. Este procedimento baseia diversas metodologias de adesivação das lâminas: *histobond*®, *superfrost plus*®, silanização, entre outros.

8.3.1 Cromo-alúmen gel

Este método é fácil de aplicar e permite bons resultados. Tem a desvantagem de fazer “ponte” entre o vidro e os corantes, levando a que as lâminas no final da téc-

nica fiquem, em toda a sua extensão, coradas da cor do corante de contraste. Uma vez que utiliza substâncias de origem orgânica, há tendência para a formação de contaminantes (fungos e bactérias) nas lâminas preparadas e armazenadas.

8.3.2 Vectabond

Este método permite bons resultados. Tem a desvantagem de utilizar reagentes tóxicos e corrosivos.

8.3.3 Lâminas com cargas electrostáticas

Estas lâminas são adquiridas já preparadas (*ex. superfrost plus*) e permitem excelentes resultados. Apesar de serem relativamente dispendiosas são muito fáceis de utilizar pois são prontas a utilizar. Trata-se de um método muito utilizado em laboratórios com um grande volume de trabalho e poucos recursos humanos.

8.3.4 3-Amino-Propil-Trietoxisilane (APES/TESPA/SILANE)

Trata-se de um dos métodos mais utilizados, e, apesar de utilizar reagentes tóxicos e corrosivos, permite obter lâminas adesivadas de forma rápida, simples e pouco dispendiosa. A técnica para utilização deste composto está em Apêndice 1.

8.4 Microtomia

Os cortes para imunomarcção (Figura 84) deverão ser o mais finos possível (2-4µm) e não deverão possuir pregas ou estrias que facilitam o descolar nas lavagens e recuperação antigénica⁵. É importante que estejam colocados numa posição central da lâmina, que por sua vez deve ter esmerilados de boa qualidade para que não se apaguem os números de registo.

O corte não deve ser demasiado espesso, principalmente quando se utilizam aparelhos automáticos com funções baseadas em capilaridade. Na altura do corte, se o bloco histológico a estudar já se encontrar desbastado não se deve proceder a um novo desbaste, de forma a manter a mesma superfície de corte obtida na HE (Hematoxilina-Eosina), garantindo assim comparação entre os casos.

Após o corte, as lâminas permanecem o tempo necessário na estufa para que o tecido adira à lâmina (e.g. 20min a 80°C).

9 RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA

No ano de 1974, Taylor, Hambridge e Burns defenderam a importância da aplicação da imunohistoquímica a cortes de parafina, procedimento que não era feito até então, indicando que esse passo traria uma verdadeira revolução na anatomia patológica⁸⁷. No entanto, o desejo destes autores esbarrou num obstáculo: a maioria dos antígenos investigados são significativamente influenciados pela fixação em formaldeído que provoca alterações conformacionais dos epítomos⁵³.

Para ultrapassar esse problema, após alguns anos de investigação, estabeleceu-se que alguns métodos de tratamento dos tecidos podem levar à reorganização proteica e devolver quase toda a estrutura tridimensional da proteína à sua configuração nativa⁵³. Surgiu assim o conceito de recuperação antigênica⁸⁵ ao demonstrar-se que as alterações conformacionais dos epítomos não eram irreversíveis, como era teoria até então⁶, desde que as proteínas mantenham a sua estrutura primária fornecida pelo conjunto de aminoácidos⁵¹.

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

9.1 Consequências da fixação

As alterações decorrentes da fixação podem ser de tal maneira extensas que levam ao não reconhecimento do antígeno fixado por parte do seu anticorpo específico.

As consequências da fixação dependem de:

- A. Concentração de formaldeído;
- B. pH;
- C. Temperatura °C;

D. Duração da fixação.

No final da fixação e processamento histológico podem existir três tipos de situações:

- A. Pode ser possível detetar diversos antigénios teciduais mesmo após fixação e consequente alteração proteica, não sendo necessário recorrer a processos de recuperação antigénica;
- B. Alguns antigénios têm o seu número diminuído nos tecidos após fixação, sendo de todo o interesse recorrer a processos de recuperação antigénica, de forma a aumentar a sensibilidade da técnica (evitando eventuais falsos negativos);
- C. Outros antigénios ficam completamente obstruídos pela fixação sendo imperioso recorrer a processos de recuperação antigénica (evitando de certeza falsos negativos).

9.2 Digestão enzimática proteolítica

Em 1975, Huang⁸⁸ refere que a utilização da digestão enzimática, com enzimas proteolíticas, nos cortes de parafina, permite evidenciar antigénios mascarados pela fixação. Estas enzimas digerem as proteínas envolvidas do epítipo, expondo assim antigénios que estavam obstruídos ou mascarados pelas alterações estruturais decorrentes da fixação e tornando possível o seu reconhecimento pelo anticorpo⁸⁸. No entanto, este tratamento enzimático nem sempre é eficaz: muitas vezes não consegue recuperar os epítipos em estudo ou os epítipos são, eles próprios, digeridos pelas proteases, conduzindo deste modo a resultados falsos negativos¹⁴, devendo o processo de digestão enzimática ser controlado de forma extremamente rigorosa.

Podem ser utilizadas várias enzimas proteolíticas como: pronase, tripsina, proteinase K ou pepsina. Para a digestão enzimática em banho-maria a temperatura ideal ronda os 37°C, que é a temperatura ótima de actuação da maior parte das enzimas utilizadas.

9.3 Recuperação antigénica de origem térmica por alta temperatura

A recuperação antigénica por alta temperatura consiste no aquecimento a alta temperatura de cortes histológicos de modo a recuperar a antigenicidade obstruída pela fixação em formaldeído⁸⁹.

Na década de 40, Fraenkel-Conrat e seus colaboradores⁹⁰ realizaram diversos estudos bioquímicos sobre as interações entre o formaldeído e as proteínas, demonstrando que as ligações induzidas podiam ser destruídas por aquecimento a altas temperaturas ou por tratamento em soluções alcalinas fortes. Muito posteriormente, em 1991, estudos efetuados por Shi e colaboradores permitiram um grande avanço nas investigações sobre a recuperação antigénica ao descobrirem que o processamento das lâminas de imunohistoquímica a alta temperatura quando mergulhadas em soluções específicas é um fator muito importante e eficaz nesta técnica. Estes investigadores demonstraram⁸⁵:

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

Apesar de se saber que as proteínas desnaturam entre os 70°C e os 90°C, verifica-se que nos tecidos fixados, elas resistem à desnaturação a estas temperaturas⁹¹. Muitos outros investigadores puderam comprovar esta descoberta, nomeadamente, Kawai e colaboradores⁹² que concluíram que a recuperação antigénica a 90°C durante 10 minutos é mais eficaz do que a 60°C durante 120 minutos. Em 1993, Cattoretti e colaboradores⁹³, confirmam a eficácia desta técnica e propõem alternativas à solução de recuperação antigénica de metais pesados, utilizada até então. A partir dessa altura, a solução de tampão citrato 0,01M a pH 6.0 passou a ser a solução de recuperação antigénica mais utilizada. No entanto, posteriormente, verificou-se que não existe uma única que se adeque de forma universal a todos os tipos de antigénios⁵. Assim, devem-se testar os vários anticorpos, até serem encontradas as condições ideais de recuperação antigénica.

Outro fator muito importante é o pH das soluções utilizadas. De acordo com Shi e colaboradores⁹⁴:

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

Alguns investigadores chegam mesmo a afirmar que o valor do pH de uma solução de recuperação antigénica é mais importante do que a composição química da mesma, principalmente para antígenos nucleares e de membrana celular⁹⁴.

A existência de agentes quelantes (promovem a extração dos iões cálcio do tecido) também afeta de algum modo a recuperação antigénica^{95,96}, surgindo antígenos com preferência por determinados agentes quelantes, normalmente o ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA) entre outros - Figura 88.

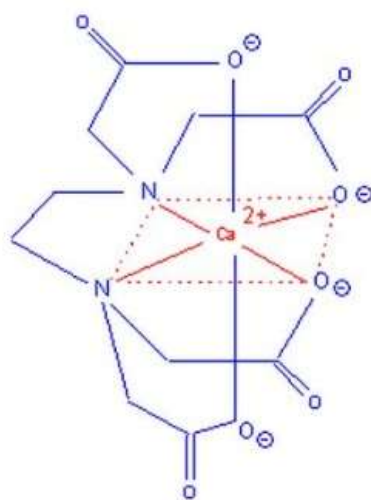


Figura 88 – Reação entre Ca²⁺ e EDTA

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

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

- A. Tampão EDTA 1mM pH 8.0;
- B. Tampão citrato pH 6.0;
- C. Tampão Tris-EDTA pH 9.0.

Como forma de obtenção de alta temperatura foram testados vários métodos, tais como: forno de micro-ondas⁸⁵, autoclave⁹⁷⁻¹⁰⁰, panela de pressão^{101,102}, banho de água quente⁹² e vapor quente^{103,104}. Destes, os mais utilizados atualmente, são o micro-ondas e a panela de pressão, sendo ambos bastante semelhantes e eficazes. Se por um lado a panela de pressão exige um maior consumo de solução tampão

relativamente ao micro-ondas, por outro lado, o micro-ondas obriga a uma maior duração do processamento.

Para a recuperação térmica em forno micro-ondas é utilizada frequentemente uma potência de 750W durante 15/20 minutos e para a panela de pressão o processamento normalmente dura 3/4 minutos à pressão máxima. Em qualquer destes procedimentos a morfologia geral do tecido não é, regra geral, particularmente afetada.

No que diz respeito ao uso da panela de pressão, a quantidade de tampão colocada depende do diâmetro da panela, devendo sempre ter-se em atenção o facto de que as lâminas devem ficar totalmente submersas durante todo o procedimento pelo que a solução tampão deve estar cerca de 1cm acima do nível das lâminas. As lâminas só são colocadas na panela quando a solução já está em ebulição e o tempo começa a ser cronometrado a partir do momento em que é alcançada a pressão máxima da panela, o que demora cerca de 2 minutos depois de fechada.

A grande vantagem da utilização de panela de pressão tem a ver com o facto do efeito da pressão no ponto de ebulição dos líquidos ser no sentido de que aumentando a pressão, se eleva o ponto de ebulição. Um líquido entra em ebulição quando a sua pressão de vapor é igual à pressão externa e como a pressão de vapor cresce com a temperatura, aumentando a pressão externa, aumenta o ponto de ebulição. Assim, são atingidas temperaturas mais elevadas na panela de pressão do que nos outros sistemas de aquecimento. A título de exemplo pode-se evidenciar que uma panela de pressão que atinja os 15 psi pode levar ao aumento do ponto de ebulição da água para os 120°C¹⁰⁵.

Em qualquer um dos procedimentos de aquecimento as lâminas têm que ser arrefecidas, 15min na própria solução (à temperatura ambiente) seguida de breves passagens em água corrente e, posteriormente, água destilada ou tampão de lavagem.

O sucesso da recuperação antigénica demonstrou que a modificação da estrutura proteica induzida pelo formol é um processo reversível sobre certas condições e desde que as proteínas mantenham a sua estrutura primária fornecida pelo conjunto de aminoácidos⁵¹.

A introdução de métodos de recuperação antigénica foi, sem dúvida, um dos principais avanços que permitiram o desenvolvimento da Imunohistoquímica até ao

modo que hoje conhecemos, pois até ao seu aparecimento somente uma pequena percentagem de antígenos podia efectivamente ser detectada. Com o aumento de substâncias detectáveis nos tecidos ou células aumentou a procura da Imunohistoquímica tanto ao nível do diagnóstico, como do prognóstico, como da indicação terapêutica.

10 INIBIÇÃO DE PARTÍCULAS ENDÓGENAS

10.1 Peroxidase Endógena

Existe principalmente em tecidos com glóbulos vermelhos, mas também ao nível do Baço, Rins, Fígado, Medula óssea e em áreas de necrose. É bloqueada por um excesso de substrato (H_2O_2) que leva à saturação da atividade enzimática. Para a inibição efectiva da peroxidase endógena pode ser utilizada uma solução de H_2O_2 a 1.5% - 3% em água destilada imediatamente após a desparafinação/hidratação ou noutro momento considerado adequado.

10.2 Fosfatase Alcalina

Existe em pequena quantidade no rim, fígado e osso. O bloqueio é feito por adição de levamisole a 5mM à solução de revelação. As fosfatases alcalinas do intestino não podem ser inibidas desta forma.

10.3 Glucose Oxidase

Não existe nos mamíferos.

10.4 Pontos susceptíveis de atrair proteínas

Podem ser pontos hidrofóbicos, electrostáticos ou outros. Estas estruturas teciduais podem existir em qualquer órgão ou tecido e poderão provocar o aparecimento de coloração de “fundo” ou de marcação inespecífica. Deverão ser anulados ou inibidos utilizando várias técnicas como:

- A. Utilização de soro normal não imune de uma espécie animal diferente da utilizada para produzir o anticorpo primário, aplicado imediatamente antes do soro primário;
- B. Utilização de PBS ou TBS de lavagem e de diluição de soros com um detergente (ex. *triton X100*; *tween 20*);
- C. Utilização de PBS ou TBS de diluição de soros com albumina sérica bovina (BSA) a 0.05%.

10.5 Causas de marcação inespecífica⁵

- A. Interações hidrofóbicas.

- B. Interações iônicas.
- C. Atividade enzimática endógena.
- D. Anticorpos naturais.
- E. Anticorpos contaminantes.
- F. Difusão antigénica.
- G. Reações cruzadas.
- H. Recetores Fc.
- I. Outros:
 - a. Tecido necrosado
 - b. Fixação deficiente
 - c. Má desparafinação

11 IMUNOCITOQUÍMICA

11.1 Enquadramento histórico

Tal como foi referido no início deste documento, considera-se imunocitoquímica o conjunto de metodologias que usam imuno-ensaios para co-localizar um epítopo de interesse em esfregaços citológicos, preparações citocentrifugadas (e.g. *cytopin*[™]) ou preparações monocamada (e.g. *thinprep*®)¹.

Em 1980, Nadji descreveu as potencialidades do diagnóstico imunocitoquímico, criando um método de imunoperoxidase ligeiramente modificado que aplicou em amostras de citologia aspirativa e esfoliativa, no sentido de avaliar a histogénese de células neoplásicas e diferenciar populações linfóides reativas e neoplásicas. Verificou que a técnica era exequível, permitindo uma boa morfologia, o que lhe pareceu justificar uma mais ampla aplicação desta metodologia no diagnóstico citológico de rotina¹⁰⁶.

Por sua vez, Chess e Hadju em 1986, concluíram que as técnicas padrão de imunoperoxidase, podem contribuir para a resolução de certos problemas de diagnóstico em citologia. No entanto, os resultados devem ser interpretados com prudência e com pleno conhecimento das limitações da técnica¹⁰⁷.

Um estudo posterior de Koss, em 1990, contudo, demonstrou que a aplicabilidade da imunocitoquímica era condicionada pela fragilidade e baixa quantidade celular das amostras, verificando-se que nem sempre a interpretação dos resultados é fácil e a ocorrência de situações que podem levar a falsos positivos, é muito elevada¹⁰⁸.

Num outro estudo, Flens e colaboradores, compararam os resultados de imunocitoquímica com os de imunohistoquímica e concluíram que existiam uma elevada concordância (90%) entre estas metodologias, tendo estimado que em 50% dos casos, a imunocitoquímica contribuiu para um diagnóstico correto¹⁰⁹.

Com o surgimento das técnicas de recuperação antigénica e com o aumento das capacidades ampliativas proporcionado pelos modernos sistemas de deteção, a imunocitoquímica tem-se tornado uma importante ferramenta de auxílio ao diagnóstico citológico. Todavia, embora os resultados tenham melhorado ao longo dos últimos anos, ainda não atingiram os níveis de sucesso obtidos com a imunohistoquímica de material biológico fixado em formaldeído e incluído em parafina^{110,111}.

11.2 Aplicação da imunocitoquímica

A análise de amostras citológicas baseia-se essencialmente na observação das características morfológicas das células, pelo que a aplicação de técnicas de imunocitoquímica constitui atualmente uma mais-valia, pois permite a caracterização molecular, através da deteção de diversas proteínas que são identificadas através da reação antigénio-anticorpo¹¹². Torna-se assim possível caracterizar neoplasias pouco diferenciadas, definir a natureza primária ou metastática da lesão, determinar a origem das lesões metastáticas e avaliar o prognóstico¹¹³.

A ampla variedade de anticorpos que se encontra disponível para uso em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina pode também ser usada nas amostras citológicas. Uma vez que a maioria das amostras citológicas são fixadas em álcool, a imunocitoquímica tem que ser capaz de atuar em amostras sujeitas a este tipo de fixação, o que se revela uma vantagem pois, com alguns anticorpos, obtém-se bons resultados nestas condições. No entanto, por serem frequentemente uma adaptação das técnicas utilizadas para caracterizar amostras histológicas, as técnicas aplicadas em amostra citológica podem apresentar resultados inconsistentes.

A aplicação da imunocitoquímica possui a vantagem de permitir caracterizar antígenos em células específicas que podem não ser observáveis em amostras histológicas, todavia, a quantidade de material em citologia é frequentemente escassa e raramente se conseguem obter lâminas em grande quantidade com homogeneidade de material celular, surgindo assim a dificuldade ou mesmo impossibilidade de se obter controlos externos.

Apesar do seu potencial único é importante ter presente que existem várias limitações para a aplicação da imunocitoquímica, destacando-se o facto dos anticorpos disponíveis no mercado estarem altamente otimizados para amostras histológicas fixadas em formaldeído e incluídas em parafina. Desta forma poderá ser útil em determinados casos processar o material citológico até ao bloco de parafina ou adaptar metodologias de fixação^{114,115}.

As principais causas de falsos positivos e de falsos negativos em imunocitoquímica estão assim associadas a fatores que vão desde a degeneração celular típica das amostras citológicas até aos anticorpos menos otimizados para estas amostras¹¹⁶ (Tabela 8).

Tabela 8 – Principais causas de resultados falsos em imunocitoquímica.

Principais Causas	
Falsos Positivos	<ul style="list-style-type: none"> •Células em autólise •Necrose •Intensa inflamação •Concentração elevada do anticorpo •Anticorpos pouco otimizados
Falsos Negativos	<ul style="list-style-type: none"> •Falha técnica •Fixação alcoólica dificulta imunomarcção por alguns anticorpos •Variabilidade na sensibilidade dos anticorpos usados

11.3 Preparação de amostras

A imunocitoquímica pode ser aplicada em esfregaços convencionais, corados ou não, amostras citocentrifugadas, amostras processadas por método de monocamada, ou ainda, amostras processadas até ao bloco de parafina ^{116,117}.

As características mais importantes de cada uma destas metodologias vão desde a sua aplicabilidade quando o material é escasso até à dificuldade causada pelo tipo de fixação utilizado (Tabela 9).

Tabela 9 – Características das metodologias de preparação de amostras citológicas.

	Pontos Positivos	Pontos Negativos
Esfregaço	<ul style="list-style-type: none"> •Simples e pouco dispendioso 	<ul style="list-style-type: none"> •Presença de fundo •Exigem grandes quantidades de anticorpo
Citocentrifugação	<ul style="list-style-type: none"> •Útil em casos de escasso material 	<ul style="list-style-type: none"> •Presença de fundo •Necessidade de maior quantidade de material
Monocamada	<ul style="list-style-type: none"> •Menos fundo •Facilidade de acesso a material que se encontra armazenado 	<ul style="list-style-type: none"> •A fixação em metanol pode interferir com alguns antigénios
Bloco parafina	<ul style="list-style-type: none"> •Uso de controlos •Material facilmente armazenado 	<ul style="list-style-type: none"> •Amostras com pouco material não podem ser usadas

11.3.1 Esfregaço convencional

Os esfregaços convencionais, por possuírem geralmente maior quantidade de células, permitem a subdivisão de forma a serem aplicados vários anticorpos na mesma lâmina. No entanto, existe elevada probabilidade de ocorrência de imunomarcção de fundo devido à presença de sangue, material necrosado, fluidos celulares ou diátese inflamatória. Outra desvantagem é a necessidade de uma grande quantidade de anticorpo para cobrir a amostra celular na sua totalidade¹¹⁰.

11.3.2 Processamento em monocamada

O material citológico é atualmente processado com maior frequência de acordo com a metodologia monocamada que apresenta algumas vantagens para aplicação de técnicas de imunocitoquímica, pois o material é colhido diretamente para uma solução fixadora, prevenindo a ocorrência de artefactos de secagem e otimizando a preservação celular¹¹⁸ (Figura 89).



Figura 89 - Lâmina, filtro e embalagem de fixador utilizados para método monocamada.

Fonte: <http://www.labosphera.eu/shop/>

Adicionalmente, a transferência de material para a lâmina, numa reduzida área e em monocamada, facilita a interpretação microscópica da imunomarcagem. Outra das vantagens do processamento em monocamada prende-se com o facto de permitir o armazenamento do material citológico até seis semanas após a colheita à temperatura ambiente, permitindo a preparação de lâminas adicionais¹¹⁹ (Figura 90).

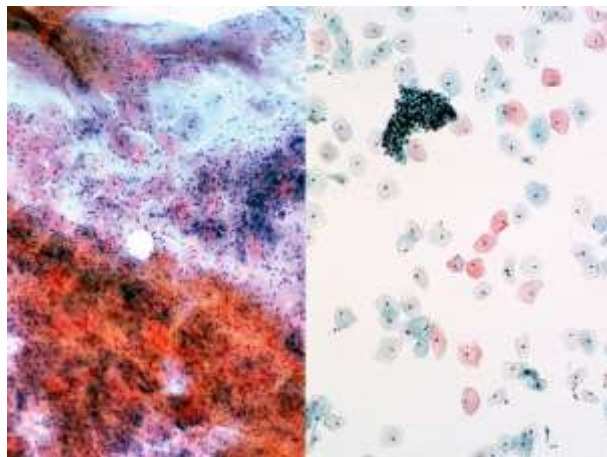


Figura 90 - Amostra de Citologia Ginecológica. Esfregaço convencional (esquerda) e método monocamada (direita). Coloração de Papanicolaou, 100x.

11.3.3 Processamento em bloco de parafina

Este tipo de processamento é aplicado em amostras citológicas, possibilitando a realização de técnicas complementares como a imunocitoquímica. Pode também ser um recurso quando existem biopsias de pequenas dimensões ou o material recolhido possui características mucóides, evitando assim perda de amostra.

Este método apresenta como principais vantagens: possibilidade de processar a totalidade da amostra sem perda de material, concentração do material facilita a inclusão e a microtomia, conservação das amostras celulares em parafina e consequente arquivo por longos períodos de tempo. Além disso, parece aumentar a sensibilidade do diagnóstico citológico¹²⁰⁻¹²².

Existem várias metodologias diferentes de preparação destas amostras incluindo o *HistoGel*, o *Cellient automated cell block system* ou o *Cytoblock*, mas não existe um método eleito universalmente pelos diferentes laboratórios¹¹⁷.



Figura 91 - HistoGel.

Fonte: <http://www.berktree.com/richard-allan-scientific-histogel-specimen-processing-gel-starter-kit-starter-kit.html>

11.4 Fixação em imunocitoquímica

Tal como na imunohistoquímica, a fixação afeta a qualidade final da imunocitoquímica, tanto ao nível da intensidade como da marcação inespecífica/fundo¹²³.

Os fixadores mais frequentemente utilizados para a conservação de amostras em citologia são os de base alcoólica (etanol e metanol) ou a acetona, que provocam a coagulação das proteínas. Em oposição, o formaldeído, utilizado vulgarmente na fixação de amostras histológicas, exerce o seu efeito ao estabelecer pontes de metileno entre aminoácidos, o que, entre outras consequências, promove uma inativação enzimática por via da alteração estrutural das proteínas^{124,125}.

Tendo em conta que a aplicação das técnicas de imunomarcagem em material citológico parece levar a resultados menos consistentes comparativamente com a apli-

cação das técnicas de imunomarcção em amostras histológicas, devido à maior incidência de falsos negativos, falsos positivos e marcação de fundo^{110,111,116,126}, alguns autores têm demonstrado que a introdução de uma etapa de pós-fixação, mergulhando as lâminas citológicas em formaldeído, poderá incrementar a qualidade da imunomarcção¹¹⁸. Nestes casos poderá ser introduzida uma etapa de recuperação antigénica no protocolo de imunomarcção pois parece ser benéfica para a qualidade da técnica¹¹⁸. Existem mesmo publicações que demonstram que a recuperação antigénica por alta temperatura pode ser incluída nos protocolos de imunocitoquímica de material fixado por reagentes coagulativos, permitindo bons resultados sem modificações morfológicas¹²⁷.

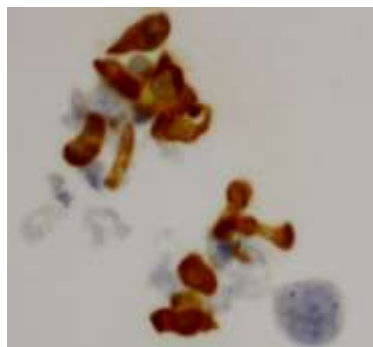


Figura 92 – Imunomarcção para Citoqueratinas 8/18 em amostra citológica com pós-fixação em Formaldeído (400x).

Fonte: Barata C, Anágua M, Roque R, Borges-Ferro A. Imunocitoquímica em amostras brônquicas processadas em ThinPrep: comparação de três métodos de pós-fixação. NewsLab Aguarda Publicação.

Não existe, no entanto, consenso relativamente ao fixador ideal sendo recomendável, no sentido de otimizar a qualidade da imunocitoquímica, padronizar e validar todas as condições de realização das técnicas para cada laboratório, tendo em conta o tipo de amostra e o antígeno que se pretende identificar.

12 CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade da técnica é da responsabilidade do Profissional Técnico de Anatomia Patológica que a executou e surge como um dos passos mais importantes do seu desempenho, pois implica conhecimentos profundos e capacidade crítica rigorosa.

Todas as lâminas que saem de um laboratório de imunohistoquímica têm que ser avaliadas pelo Técnico responsável e ponderada a sua qualidade, tirando daí as consequentes ilações, tendo como objectivo máximo a melhoria permanente da qualidade do produto final do seu trabalho.

Tipos de controlo de qualidade:

- A. Controlo de procedimentos
 - a. Substituição de reagentes
- B. Controlo tecidual
 - a. externo
 - i. Positivo
 - ii. Negativo
 - b. Interno
 - i. Positivo
 - ii. Negativo

12.1 Avaliação da qualidade da imunohistoquímica

De forma a permitir a interpretação e avaliação de lâminas de imunohistoquímica, é importante possuir uma escala de avaliação que quantifica os parâmetros preservação da morfologia do tecido, sensibilidade e especificidade.

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

de dados, pois a falta de normas simples e objetivas podem também ser uma causa da falta de reprodutibilidade de um procedimento.

Apesar de já existirem alguns programas informáticos que permitem avaliar a qualidade da imunomarcção por análise de imagem, o seu preço elevado e a sua irregular sensibilidade e reprodutibilidade implicam uma baixa implantação, pelo que a quantificação automatizada da marcação imunohistoquímica ainda constitui um problema de estandardização por resolver¹²⁸.

Segundo Barnes e seus colaboradores, na avaliação da qualidade dos resultados das técnicas imunohistoquímicas é importante que, entre os métodos rigorosamente construídos, se selecione um que seja “*easy, quick and reproducible*”¹²⁹, enquanto para o *International Concensus Group on Standardization and Quality Control in Immunohistochemistry* importa que exista uma garantia de validação relativamente à interpretação uniforme do método imunohistoquímico^{130,131}.

Estas diretrizes fundamentaram a escolha do método de avaliação da imunomarcção utilizado neste trabalho, tendo-se optado por uma metodologia simples, objetiva e operacionalizada baseada em Leake¹³² e defendida por vários grupos de trabalho, nomeadamente o *UK Receptor Group*, o *UK National External Quality Assessment Scheme for Immunocytochemistry*, o *Scottish Breast Cancer Pathology Group* e o *Receptor and Biomarker Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer*. Trata-se de um método de avaliação que surge na continuidade dos estudos de Allred e colaboradores¹³⁰ e Harvey e colaboradores¹³³, procurando por oferecer elevada consistência na reprodutibilidade intra e inter-observadores (Figura 93).



Figura 93 – Conceptualização da metodologia de recolha de dados

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

12.1.1 Preservação da morfologia do tecido

É fundamental que uma metodologia imunohistoquímica garanta a estabilidade do substrato onde é aplicada, independentemente de este ser fresco ou de se apresentar fixado, ou então de se constituir em base citológica ou base histológica. A operacionalização será direta criando-se uma escala ordinal que corresponde a uma hierarquia iniciada na opção “ausência total de preservação morfológica do tecido” que corresponde à pior situação possível, e terminando na opção “preservação perfeita da morfologia do tecido” que corresponde à melhor situação possível (ver Tabela 15).

12.1.2 Sensibilidade

A sensibilidade é definida como a capacidade de reconhecer os verdadeiros positivos¹³⁴. Partindo deste princípio poderemos operacionalizar este parâmetro analisando e classificando a intensidade da marcação específica e a quantidade relativa de estruturas marcadas.

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

12.1.3 Especificidade

Genericamente pode-se afirmar que a especificidade é a capacidade de reconhecer os verdadeiros negativos¹³⁴. Em imunohistoquímica, a especificidade de um anticorpo permite-lhe reconhecer e estabelecer ligações com antigénios individualizados e específicos. Partindo deste princípio pode-se inferir, em oposição, que a inespecificidade é a capacidade de um anticorpo estabelecer ligações com estruturas que não estiveram na sua génese. Aplicando estes conceitos à marcação imunohistoquímica podemos caracterizar como inespecífica a presença de marcação em células ou em estruturas extracelulares que não deveriam estar marcadas, uma vez que o anticorpo não é dirigido contra elas. Assim, quanto maior for a quantida-

de de estruturas marcadas relativamente às estruturas “não elegíveis” (verdadeiros negativos) tanto pior é a qualidade da imunomarcação.

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

12.1.4 Contraste

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

12.1.5 Operacionalização do instrumento de recolha de dados

Quantificou-se a qualidade da marcação imunohistoquímica constituindo como metodologia de recolha de dados a observação microscópica com recurso a uma grelha de avaliação que permite atribuir uma pontuação aos parâmetros: intensidade de imunomarcação, imunomarcação específica, imunomarcação não específica e intensidade da coloração de contraste - Figura 94.

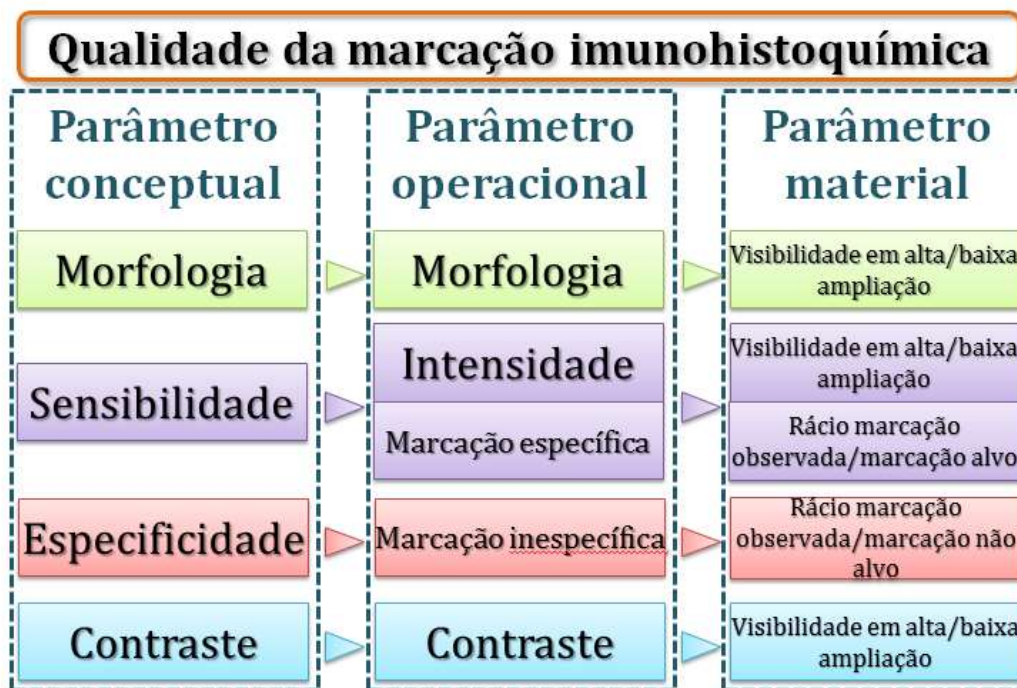


Figura 94 – Operacionalização da metodologia de recolha de dados

12.1.5.1 Preservação da morfologia do tecido

A preservação da morfologia do tecido permite avaliar a capacidade de agressão tecidular dos métodos utilizados. Este item obterá expressão prática submetendo-o a hierarquização numa escala ordinal que se inicia em *ausência de preservação morfológica que invalida a avaliação*, que corresponde à pior situação possível, passa por *ausência de preservação morfológica que não invalida a avaliação*, e termina em *preservação perfeita da morfologia* que corresponde à melhor situação possível.

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

Tabela 10 - Classificação da preservação da morfologia

Valor	Características	Operacionalização
0	Ausência de preservação morfológica que invalida a avaliação	Alterações visíveis em baixa ampliação – 40x
-	---	---
2	Ausência de preservação morfológica que não invalida a avaliação	Alterações visíveis somente em grande ampliação – 100x
-	---	---
4	Preservação da morfologia	Sem alterações visíveis

12.1.5.2 Intensidade de imunomarcação

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

Após a visualização ao microscópio da totalidade do tecido em estudo é classificada a intensidade de marcação de acordo com uma escala de cinco níveis associados aos valores 0 a 4 (Tabela 11).

Tabela 11 - Classificação da intensidade de imunomarcação

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

12.1.5.3 Proporção de imunomarcação específica

A proporção de imunomarcação específica permite examinar o rácio entre estruturas "marcáveis" e estruturas marcadas. Este item obterá expressão prática submetendo-o a hierarquização numa escala ordinal que se inicia em *0% de marcação do alvo* que corresponde à pior situação possível e terminando em *marcação em 90 a 100% do alvo* que corresponde à melhor situação possível. Após a visualização ao microscópio da totalidade do tecido em estudo é classificada a proporção de estruturas verdadeiras-positivas de acordo com uma escala de quatro níveis associados aos valores 0 a 4 (Tabela 12).

Tabela 12 - Classificação da imunomarcação específica

Valor	Características	Operacionalização
0	0% de marcação do alvo	---
1	Marcação de 1 a 10% do alvo	Estimativa de marcação de 1 em 10 estruturas alvo
2	Marcação em 11 a 49% do alvo	Estimativa de marcação de até 4 em 10 estruturas alvo
3	Marcação em 50 a 89% do alvo	Estimativa de marcação de até 8 em 10 estruturas alvo
4	Marcação em 90 a 100% do alvo	Estimativa de marcação de até 10 em 10 estruturas alvo

12.1.5.4 Proporção de imunomarcação inespecífica

A proporção de imunomarcação inespecífica permite examinar o rácio entre estruturas "não marcáveis" e estruturas marcadas. Este item obterá expressão prática submetendo-o a hierarquização numa escala ordinal que se inicia em *marcação de estruturas não-alvo que invalida a avaliação* que corresponde à pior situação possível

vel, passa por *marcação de estruturas não-alvo que não invalida a avaliação* e termina em *Ausência de marcação de estruturas não-alvo* que corresponde à melhor situação possível.

Após visualização microscópica da totalidade do tecido em estudo, é classificada a proporção de estruturas falsas-positivas de acordo com uma escala de cinco níveis associados aos valores 0 a 4 (Tabela 13).

Tabela 13 - Classificação da imunomarcação inespecífica

Valor	Características	Operacionalização
0	Marcação de estruturas não-alvo que invalida a avaliação	Estimativa de marcação de 3 em 3 estruturas não-alvo
-	---	---
2	Marcação de estruturas não-alvo que não invalida a avaliação	Estimativa de marcação de até 1 em 3 estruturas não-alvo
-	---	---
4	Ausência de marcação de estruturas não-alvo	Estimativa de marcação de 0 em 3 estruturas não-alvo

12.1.5.5 Intensidade de coloração de contraste

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

Após a visualização ao microscópio da totalidade do tecido em estudo é classificada a intensidade da coloração de contraste de acordo com uma escala de cinco níveis associados aos valores 0 a 4 (Tabela 14).

Tabela 14 - Classificação da intensidade de coloração de contraste

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

12.1.6 Score final

Foi possível assim construir uma grelha final coligindo todos os itens anteriormente referidos (Tabela 15).

Tabela 15 – Grelha de avaliação de qualidade da imunohistoquímica

Pontos	Preservação da morfologia tecidual	Sensibilidade		Especificidade	Contraste
		Intensidade da marcação específica	Quantidade relativa de estruturas marcadas	Marcação inespecífica/fundo	
0	Ausência de preservação morfológica que invalida a avaliação	Intensidade de marcação nula	0% de estruturas marcadas	Marcação de estruturas não-alvo que invalida a avaliação	Ausência de coloração
1	-	Intensidade de marcação fraca	1 a 10% de estruturas marcadas	-	Coloração de fraca intensidade
2	Ausência de preservação morfológica que não invalida a avaliação	Intensidade de marcação moderada	11 a 49% de estruturas marcadas	Marcação de estruturas não-alvo que não invalida a avaliação	Coloração de moderada intensidade
3	-	Intensidade de marcação forte	50 a 89% de estruturas marcadas	-	Coloração de forte intensidade
4	Preservação perfeita da morfologia	Intensidade de marcação muito forte	90 a 100% de estruturas marcadas	Ausência de marcação de estruturas não-alvo	Coloração de muito forte intensidade

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

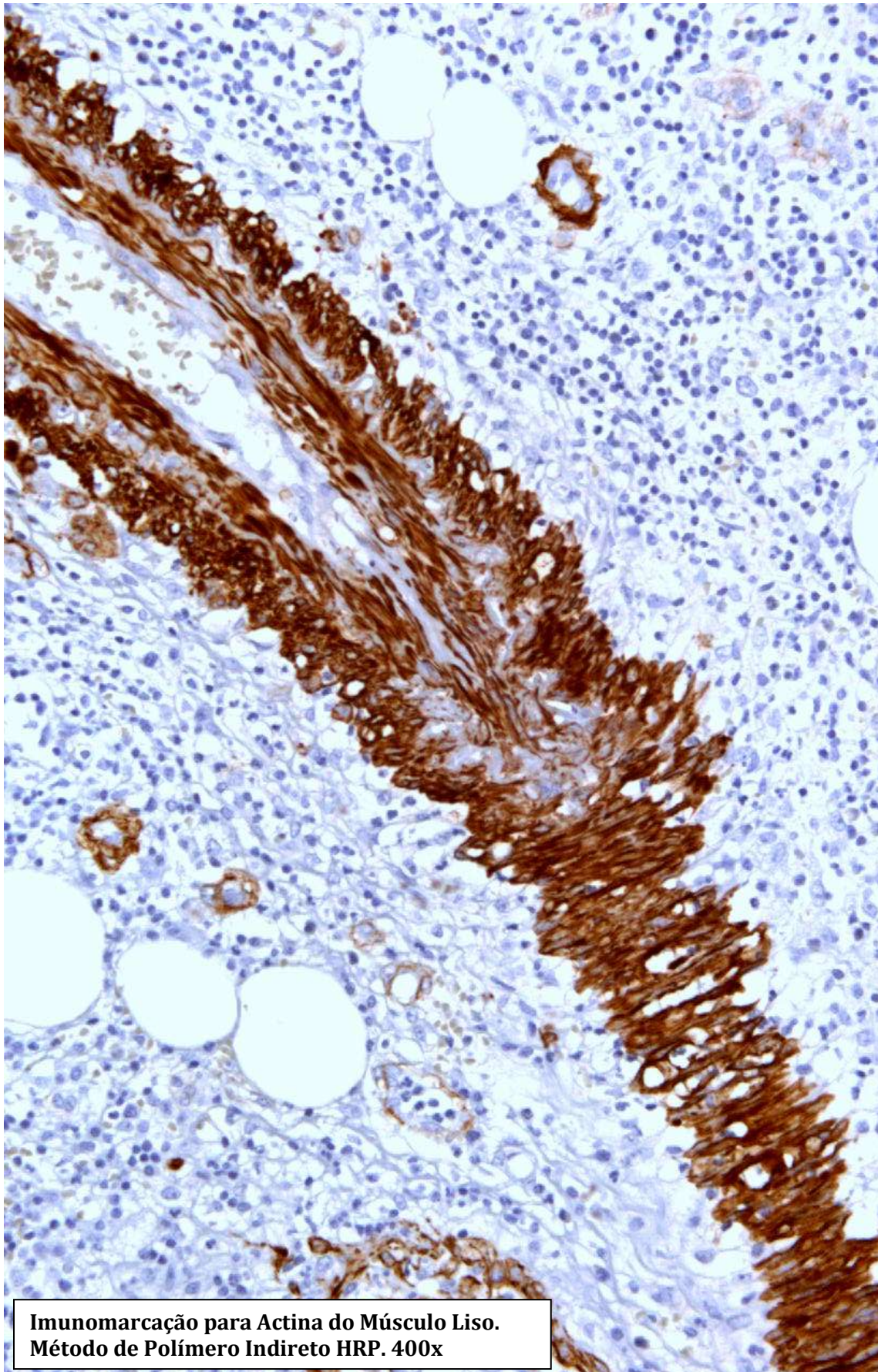
12.1.6.1 Factores de ponderação

Numa tentativa de valorizar os itens que mais contribuem para a qualidade final da marcação imunohistoquímica foram introduzidos fatores de ponderação. O item considerado mais relevante foi “intensidade de imunomarcação” pelo que lhe foi atribuído o fator de ponderação 3. Em seguida foi considerado o item “imunomarcação específica” com o fator de ponderação 2. Finalmente surgem os parâmetros “preservação da morfologia do tecido”, “imunomarcação não específica” e “intensidade da coloração de contraste” com o fator de ponderação 1 (Tabela 16).

Tabela 16 – Fatores de ponderação do score final da qualidade da imunohistoquímica

	Preservação da morfologia do tecido	Sensibilidade		Especificidade	Contraste
		Intensidade da marcação específica	Quantidade relativa de estruturas marcadas	Marcação inespecífica/fundo	
Factor de ponderação	1	3	2	2	1

Desta forma procura-se garantir que ao maior score equivale a melhor qualidade de marcação imunohistoquímica. O score final pode tomar valores entre 0 (pior resultado possível, em que não há intensidade de marcação imunohistoquímica, não há marcação específica, não há contraste nem preservação tecidular, havendo somente forte marcação inespecífica) e 36 (melhor resultado possível, implicando uma lâmina com todas as células marcadas especificamente com muita intensidade, um contraste também muito intenso e sem marcação inespecífica, nem destruição tecidular). Para facilitar a interpretação, o score final poderá ser multiplicado pelo fator 2,77 para se obter valores finais na escala 0-100 pontos, normalmente mais intuitiva.



**Imunomarcção para Actina do Músculo Liso.
Método de Polímero Indireto HRP. 400x**

13 AUTOMATIZAÇÃO

A automatização em imunohistoquímica é um desejo dos investigadores que se começou a desenhar no início da década de 80 do século passado. Nessa altura começaram a ser propostos equipamentos que permitiam o processamento de lâminas histológicas e citológicas com menor intervenção humana. Os primeiros aparelhos podiam ser divididos em dois grupos: os que tinham como base tecnológica a capilaridade e os que eram “caixas de incubação” com pipetadores automáticos.

Estávamos no final dos anos 80 quando a *Shandon* lança o seu *Sequenza*: um incubador para imunohistoquímica que utilizava os famosos *coverplates*. Prometia facilitar a técnica tornando-a mais organizada e fiável. Com recurso aos *coverplates* dizia-se que a reprodutibilidade e a qualidade eram excelentes, para além de poupar reagentes e garantir que as lâminas não secavam.

Permitia a realização de até 50 lâminas por sequência com controlo bastante rigoroso da duração da incubação pois possuía um temporizador incorporado que permitia 5 contagens independentes. Alguns destes equipamentos ainda estão em uso atualmente com bons resultados.



Figura 95 – Shandon Sequenza

Fonte: [https://scontent-a-lhr.xx.fbcdn.net/hphotos-xaf1/v/t1.0-](https://scontent-a-lhr.xx.fbcdn.net/hphotos-xaf1/v/t1.0-9/384563_319436328073433_1119716805_n.jpg?oh=c9f7b7b6728b941093089e498f9d21f2&oe=54CE7B5D)

[9/384563_319436328073433_1119716805_n.jpg?oh=c9f7b7b6728b941093089e498f9d21f2&oe=54CE7B5D](https://scontent-a-lhr.xx.fbcdn.net/hphotos-xaf1/v/t1.0-9/384563_319436328073433_1119716805_n.jpg?oh=c9f7b7b6728b941093089e498f9d21f2&oe=54CE7B5D)

O *Cadenza* da *Shandon* foi um dos primeiros equipamentos a propor automatização da imunohistoquímica. Conseguia armazenar em memória 10 protocolos diferentes com um máximo de 20 passos cada. Processava um número extraordinário para a época de 20 lâminas em simultâneo.



Figura 96 – Shandon Cadenza

Fonte: [https://fbcdn-sphotos-g-a.akamaihd.net/hphotos-ak-xaf1/v/t1.0-](https://fbcdn-sphotos-g-a.akamaihd.net/hphotos-ak-xaf1/v/t1.0-9/313537_319443108072755_767725798_n.jpg?oh=ac3d7efdaf738eb2a0b75c617d26df24&oe=54C24874&__gda__=1421152677_596903ed35efede73fe0167c5336c292)

[9/313537_319443108072755_767725798_n.jpg?oh=ac3d7efdaf738eb2a0b75c617d26df24&oe=54C24874&__gda__=1421152677_596903ed35efede73fe0167c5336c292](https://fbcdn-sphotos-g-a.akamaihd.net/hphotos-ak-xaf1/v/t1.0-9/313537_319443108072755_767725798_n.jpg?oh=ac3d7efdaf738eb2a0b75c617d26df24&oe=54C24874&__gda__=1421152677_596903ed35efede73fe0167c5336c292)

Posteriormente surgiu o *Techmate* que proponha a capilaridade como princípio físico de funcionamento e permitia a identificação de vários anticorpos em simultâneo.



Figura 97 – Dako Techmate

Fonte: <http://cdn.dotmed.com/images/listingpics/517339.jpg>

O *Autostainer* foi provavelmente o “pipetor automático” que maior sucesso atingiu durante os anos 90, existindo ainda hoje vários em funcionamento. As lâminas eram colocadas na horizontal e os reagentes eram colocados em tubos de plástico localizados em suportes laterais. O aparelho era programado para pipetar os soros e proceder a lavagens a intervalos delimitados no tempo. Possuía ainda um *blower* que eliminava o excesso de tampão de lavagem de cima do tecido antes da pipetagem. Os reagentes e o tampão de lavagem eram recolhidos após utilização num recipiente à parte.



Figura 98 - LabVision Autostainer

Fonte: http://www.abbott-ir.com/upload/images/IMG_59463.jpg

No início da década de 2000 foi apresentado o equipamento que possuía a inovação tecnológica que pretendia revolucionar o mercado. Foi assim introduzida a codificação das amostras por código de barras, a “lamela líquida” que impedia a secagem do tecido e garantia a homogeneização do soro, o *vortex-mixing* e os suportes aquecidos que aceleravam a técnica, diminuindo o tempo da sua duração.

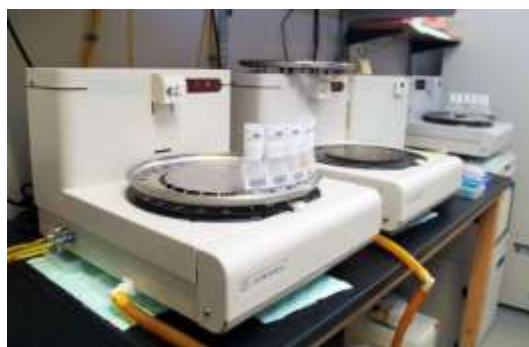


Figura 99 - Ventana Nexes

Fonte: <http://ocs.med.nyu.edu/system/files/nexes-1.jpg>

Atualmente os equipamentos são bastante mais evoluídos e permitem, por exemplo, a realização da desparafinação, hidratação e recuperação antigénica no interior da plataforma.

É agora possível garantir padrões elevados de qualidade de imunomarcção, melhorando a padronização e a rastreabilidade das operações. Além disso a maioria dos aparelhos atuais possuem elevada flexibilidade, baixo custo a longo prazo, autonomia que permite que o técnico se dedique a outras actividades científicas durante a realização da técnica e aumentam a segurança química e biológica.

13.1 Ventana Ultra

Dos aparelhos mais populares atualmente destaca-se o Ventana Ultra. Este equipamento foi concebido tendo em mente a produtividade, permitindo fluxo contínuo de trabalho e utilização simultânea de várias técnicas.

Possui 35 posições para reagentes e 30 posições para lâminas em gavetas individuais de acesso contínuo. Pode processar até 90 lâminas em 8 horas, ou 120 lâminas com um *run* suplementar durante a noite. Pode realizar simultaneamente imunohistoquímica, Hibridação *in situ*, dupla marcação e imunofluorescência.

O interface é muito apelativo e intuitivo, permitindo atualização permanente de cada exame em curso. Também permite uma variedade de protocolos personalizados pelo técnico. Existe acesso contínuo aos reagentes e resíduos para melhoria do fluxo de trabalho¹³⁵ (Figura 100, Figura 101, Figura 102, Figura 103).



Figura 100 - Ventana Ultra - vista frontal.

Fonte: <http://amadeuferro.webs.com/apps/photos/photo?photoid=145073474>



Figura 101 - Ventana Ultra - recipiente de recolha de detritos líquidos.

Fonte: <http://amadeuferro.webs.com/apps/photos/photo?photoid=145073473>



Figura 102 – Ventana Ultra – aspecto do interior.

Fonte: <http://amadeuferro.webs.com/apps/photos/photo?photoid=145073475>



Figura 103 – Ventana Ultra – reagentes.

Fonte: <http://amadeuferro.webs.com/apps/photos/photo?photoid=145073477>

13.2 Leica Bond III

Outro dos equipamentos mais populares atualmente é o Leica Bond III. Este é um aparelho até 50% mais rápido mais do que a geração anterior, não requerendo manutenção diária. Utiliza reagentes de alta qualidade e o *Covertile bond™*, líder na sua classe¹³⁶ (Figura 104, Figura 105, Figura 106, Figura 107).



Figura 104 – Leica Bond III – vista frontal.

Fonte: <http://www.icsid.org/database/images/display/sb4c1647ff60142.jpg>



Figura 105 - Leica Bond III - *covertiles* colocados na superfície das lâminas.

http://www.leicabiosystems.com/uploads/tx_leicaproducts/9_1463_05_022_28.jpg



Figura 106 - Leica Bond III - aspecto do interior.

Fonte: <http://www.pddnet.com/sites/pddnet.com/files/inventech.jpg>



Figura 107 - Leica Bond III - reagentes.

Fonte:

http://www.selectscience.net/images/products/6112_bond250.jpg.ashx?maxwidth=300&maxheight=200&bgcolor=white&mode=pad

14 IMUNOHISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO

As técnicas de imunohistoquímica são uma ferramenta poderosa ao dispor do diagnóstico anatomico-patológico e da investigação. Não obstante, a imunohistoquímica é um meio de pensar o diagnóstico e frequentemente serve de complemento a um raciocínio diagnóstico, não o substituindo. O prognóstico e a indicação terapêutica são muito condicionados pelo recurso a estas técnicas, demonstrando aqui o Técnico de Anatomia Patológica toda a sua responsabilidade e relevância para a melhoria da quantidade e qualidade de vida do doente.

De um modo geral, já são conhecidos e estudados os diferentes antigénios que podem ser expressados pelos diferentes tipos de patologias, sendo necessário, muitas vezes, detetar a sua existência para confirmar a patologia correspondente. Noutras situações recorre-se a técnicas imunohistoquímicas, não para confirmar uma suspeita proveniente do aspecto morfológico da patologia, mas sim como ferramenta de primeira linha pois o aspecto morfológico não indica caminhos definitivos. Aqui recorrem-se a algoritmos diagnósticos (Figura 108 e Figura 109), surgindo a imunohistoquímica como a principal determinante da resposta final.

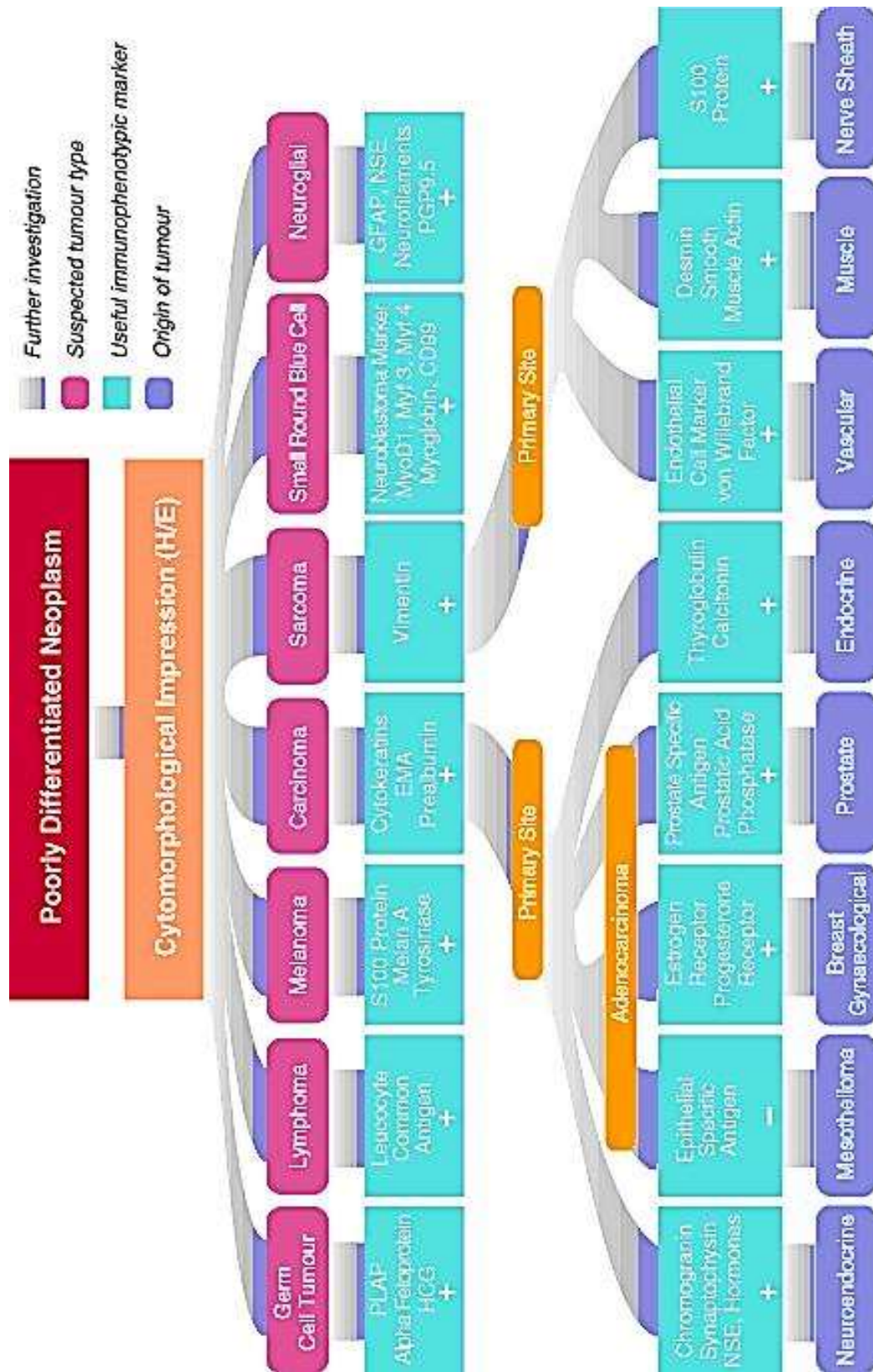


Figura 108 - Algoritmo utilizado para tumores indiferenciados.

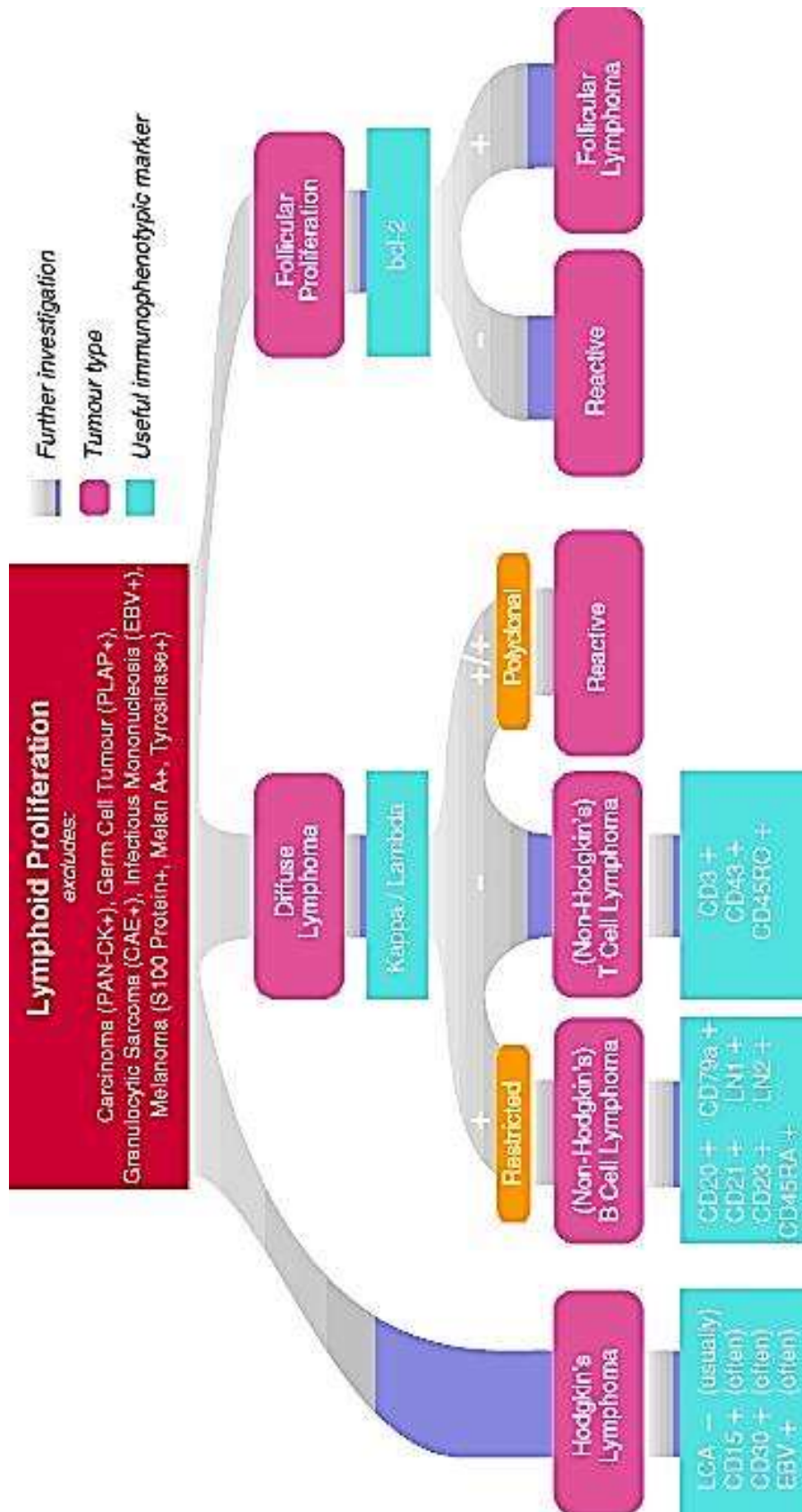


Figura 109 - Algoritmo utilizado para situações linfoproliferativas.

14.1 Principais antígenos detetados por imunohistoquímica

14.1.1 Recetores de Estrogénio

Os Recetores de Estrogénio (RE) encontram-se nas células de vários órgãos, incluindo a mama, onde funcionam como estimuladores de diversos processos biológicos, quando ativados pelo estrogénio. Por sua vez, a redução dos níveis de estrogénio no sangue reduz a atividade biológica destas células alvo, o que fundamenta a terapêutica endócrina para mulheres com carcinoma da mama positivo para RE. Uma concentração elevada de RE no tumor mamário correlaciona-se com maior resposta à terapêutica endócrina e, por consequência, a ausência de RE no tumor tornaria essa terapêutica inapropriada. Assim, o conhecimento do estado do RE tem um papel crucial na indicação terapêutica. Os *National Institutes of Health* (NIH) recomendaram, em 1979, a determinação do estado dos RE para todos os carcinomas primários da mama para, desse modo, se determinar a terapêutica mais adequada. Em 1985, os NIH e a *American Cancer Society* publicaram, de forma independente, relatórios que apoiavam a determinação do estado dos RE como auxiliar à gestão do cancro da mama. Apesar de existirem diversas abordagens cirúrgicas para reduzir os níveis de estrogénio (incluindo a ovariectomia, a hipofisectomia e a adrenalectomia), atualmente, o tratamento de eleição para os carcinomas positivos para RE é o Tamoxifeno¹³³.

O conhecimento do estado do RE nos tumores da mama auxilia igualmente na determinação do prognóstico, tendo sido demonstrado, numa série de estudos, que a presença do RE confere um prognóstico favorável, pois as doentes RE-positivas possuem uma sobrevida global significativamente maior do que as doentes RE-negativas^{137,138}(Figura 110).

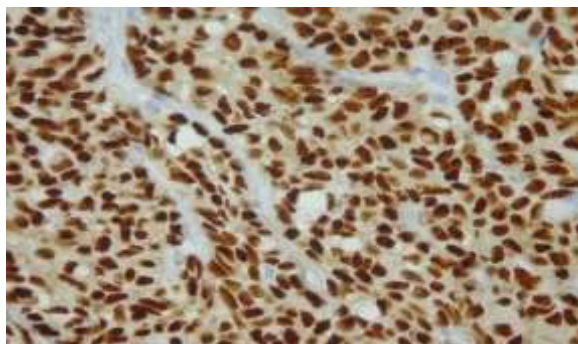


Figura 110 - Recetores de Estrogénio (HRP, 400x).

14.1.2 Recetores de Progesterona

Os Recetores de Progesterona (RPg) são proteínas específicas encontradas em vários tipos de células que se ligam à progesterona¹³⁹. Em 1996, a *American Society of Clinical Oncology*, recomendou a determinação do estado dos RE e dos RPg em todas as lesões primárias e nas metástases para identificação dos doentes que tivessem mais probabilidade de beneficiar da terapêutica endócrina adjuvante e da terapêutica para doenças recorrentes ou metastáticas. O estado dos RPg pode ter um papel importante no prognóstico, mas tendo sempre em conta que devem ser avaliados em conjunto com outros critérios clínicos¹⁴⁰.

Atualmente, os RPg são marcadores importantes para a avaliação do carcinoma na mama devido ao seu papel na determinação da funcionalidade dos recetores de estrogénio também presentes no tumor. (Figura 111).

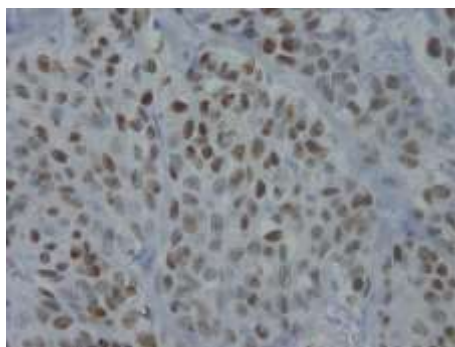


Figura 111 - Recetores de progesterona (HRP, 400x).

14.1.3 Proteína p53

Esta proteína tem funções onco-supressoras predominantes na atividade celular. A alteração do seu gene pode condicionar a sua estrutura e conseqüente funcionamento¹⁴¹. A proteína normal é denominada *wild-type*, enquanto a mutada é denominada *mutant-type*. Apesar dos anticorpos utilizados para a sua deteção não discriminarem entre os dois tipos de proteína, sabe-se que somente a *mutant-type* possui uma sobrevida em ambiente celular que lhe permite atingir quantidades detetáveis pela técnica imunohistoquímica. Desta forma, a imunomarcagem para este antigénio pressupõe que este se encontra no formato *mutant-type*, existindo alguma controvérsia sobre se a negatividade implica a presença obrigatória de *wild-type*. É, apesar de tudo, considerado um indicador de prognóstico para diversos tipos de neoplasia¹⁴² (Figura 112).

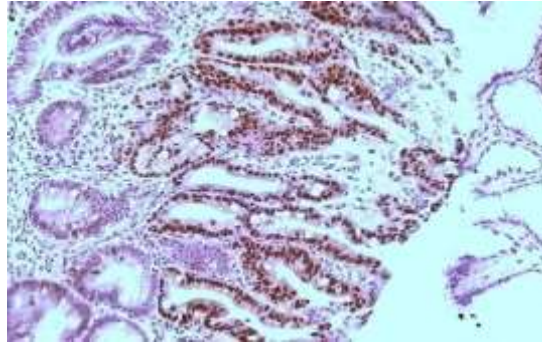


Figura 112 - Proteína p53 (HRP, 100x).

14.1.4 ERBB2

O ERBB2 (também conhecido por HER2) é um gene que expressa uma proteína, também com essa designação, que é um recetor de tipo 2 de fatores de crescimento epidérmico humano presentes em células da mama. Tem como função ajudar na regulação do crescimento saudável das células, na sua divisão e reparação. No entanto, em caso de neoplasia pode existir uma amplificação do gene (aumento do número de cópias) o que se pode traduzir numa sobreexpressão de proteína ERBB2, resultando num crescimento e divisão descontrolados de células. A deteção desta sobreexpressão em casos de carcinoma da mama pode ser feita recorrendo a técnicas de imunohistoquímica, usando anticorpos dirigidos especificamente contra a proteína ERBB2¹⁴³. Os resultados obtidos são depois avaliados de acordo com *guidelines* internacionalmente aceites¹⁴⁴ (Figura 113).

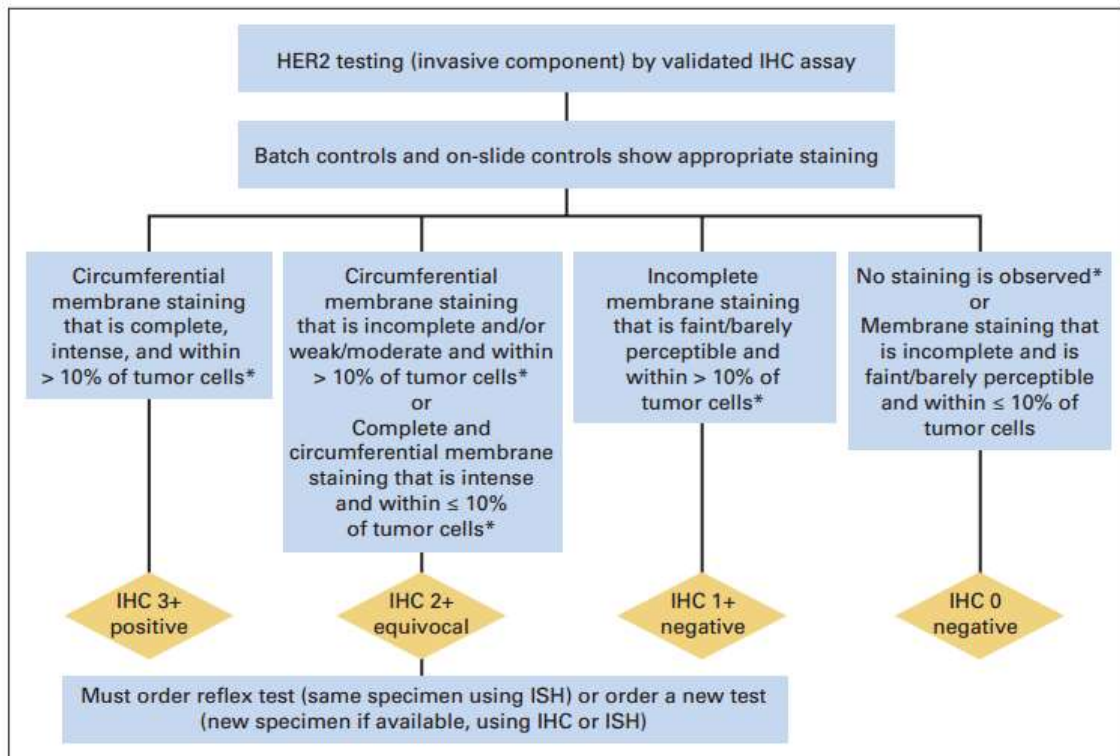


Figura 113 - Algoritmo para avaliação de expressão de ERBB2 por imunohistoquímica.

Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(31):3997-4013. doi:10.1200/JCO.2013.50.9984.

Tendo por base os resultados obtidos nas marcações imunohistoquímicas, prossegue-se então para a decisão terapêutica. Tratando-se de um carcinoma da mama ERBB2 positivo existem tratamentos específicos: aquele que é usado mais frequentemente é o Trastuzumab (ou *Herceptin*) desenvolvido pela Genentech Inc¹⁴⁵, que se trata de um medicamento cujo modo de atuação implica a sua ligação aos receptores ERBB2 impedindo a sua ligação e bloqueando assim o estímulo que induziria a célula a crescer e dividir¹⁴⁶. Para além de contribuir para reduzir a velocidade de proliferação das células tumorais, este medicamento também funciona como alerta para o sistema imunitário para destruir as células tumorais a que se encontra ligado por via das células NK¹⁴⁷.

A aplicação da imunohistoquímica para a determinação do status ERBB2 é um procedimento fundamental com implicações diretas para o diagnóstico, prognóstico e indicação terapêutica no carcinoma da mama, permitindo uma orientação mais objetiva com consequências na vida das pacientes (Figura 114).

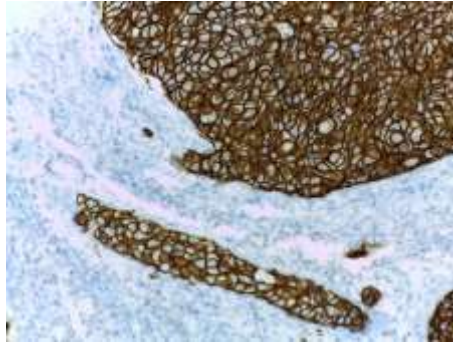


Figura 114 - ERBB2 (HRP, 100x).

14.1.5 Bcl2

O seu nome deriva do inglês *B-cell lymphoma 2* ou linfoma de células B 2, dado ser o segundo membro de um conjunto de proteínas inicialmente descritas como uma translocação genética recíproca no cromossoma 14 e 18 em linfomas foliculares. Sabe-se atualmente que esta família é constituída por genes/proteínas que regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, podendo ser pró-apoptóticos (Bax, Bad, Bak e Bok) ou anti-apoptóticos (Bcl-2 propriamente dito, Bcl-xL, e Bcl-w). Há um total de 25 genes na família Bcl2 conhecidos até ao presente.¹⁴⁸

A ausência da proteína Bcl-2 propriamente dita é necessária para o amadurecimento dos linfócitos B nos centros germinativos dos folículos linfáticos. Desta forma, a ausência de marcação imunohistoquímica para esta proteína nos referidos centros germinativos está relacionada com o normal funcionamento destas estruturas, enquanto que a presença da proteína está associada ao linfoma folicular, no qual a ativação do oncogene *bcl-2* pela translocação nos cromossomas, resulta numa sobrevivência e divisão exagerada das células B¹⁴⁹ (Figura 115).

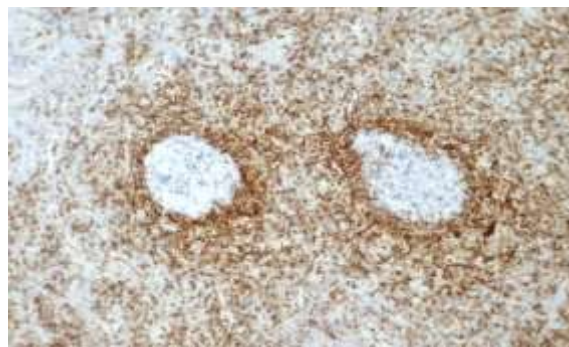


Figura 115 - Bcl-2 (HRP, 100x).

14.1.6 CD3

CD3 é uma proteína de linhagem específica considerada como um marcador global de células T. É um componente de vários domínios do complexo receptor das células T que está normalmente localizado no citoplasma de linfoblastos T imaturos e na membrana de linfócitos T maduros¹⁵⁰ (Figura 116).

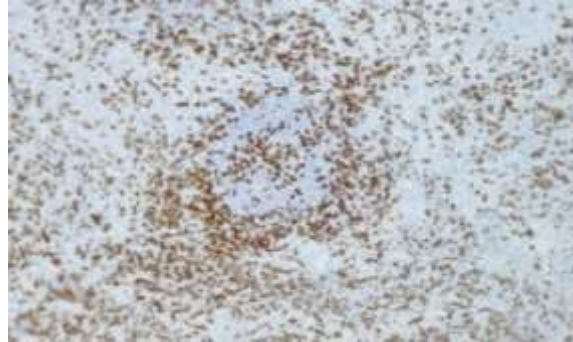


Figura 116 - CD3 (HRP, 100x).

14.1.7 CD20

O anticorpo monoclonal anti-CD20 (e.g. clone L26) identifica linfócitos B humanos, sendo produzido a partir de líquido ascítico de ratinho e é uma imunoglobulina de classe IgG2a de cadeias leves Kappa. Este anticorpo é específico para marcar linfócitos B e utiliza-se para diferenciar patologias associadas a estas células ou outras patologias do sangue tais como linfomas e leucemias¹⁵¹ (Figura 117).

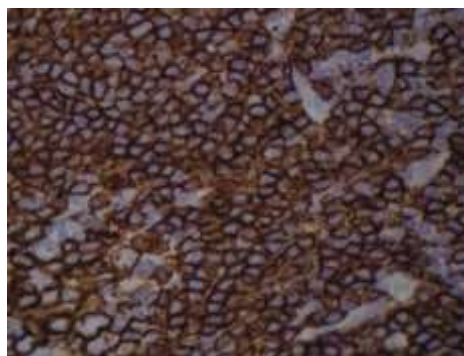


Figura 117 - CD20 (HRP, 400x).

14.1.8 Citoqueratinas 8/18

As citoqueratinas 8 e 18 humanas são filamentos intermediários do tipo I que pertencem ao grupo básico e ácido das citoqueratinas, respetivamente, encontrados no esqueleto intracitoplasmático em tecido epitelial. São proteínas com um peso molecular de 52,5kDa (8) e 45kDa (18), sendo que, em tecidos normais encontram-

se expressas no epitélio simples, glandular e de transição e ainda nos hepatócitos e ácinos pancreáticos. Em tecidos neoplásicos encontram-se expressas na maioria dos carcinomas mas ausentes nos carcinomas queratinizantes¹⁵². O anticorpo mais utilizado para a sua detecção é originário do clone 5D3, produzido por imunização de ratinho e correspondendo a uma imunoglobulina de classe IgG1 (Figura 118).

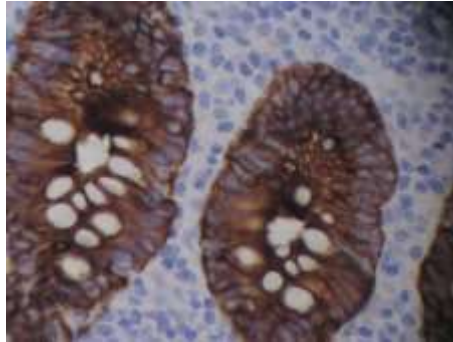


Figura 118 - Citoqueratina 8/18 (HRP, 400x).

14.1.9 CD30

O CD30 é um marcador de ativação, que é encontrado em células B ativadas e células T, mas que não é encontrado em células destes tipos em repouso ou macrófagos. O padrão de imunomarcagem do CD30 pode ser membranar, paranuclear ou ambos. Este antigénio é utilizado como um marcador para linfomas anaplásicos de grandes células e, principalmente, nas células de Reed-Sternberg no linfoma de Hodgkin, o que constitui diagnóstico diferencial para esta patologia¹⁵⁰ (Figura 119).

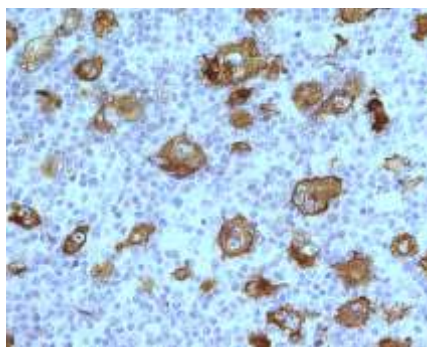


Figura 119 - CD30 (HRP, 100x).

14.1.10CD45

O antigénio CD45, também conhecido como LCA (*Leukocyte Common Antigen*) é, na realidade, uma família de proteínas do tipo tirosina-fosfato que são expressas em

praticamente todas as células linfóides e seus precursores, com exceção de eritrócitos maduros e megacariócitos, não estando presente em nenhuma célula não-hematolinfóide. Este antígeno não está também expresso em plasmócitos. O seu padrão de imunomarcção é geralmente membranar, mas poderá existir marcação paranuclear¹⁵⁰ (Figura 120).

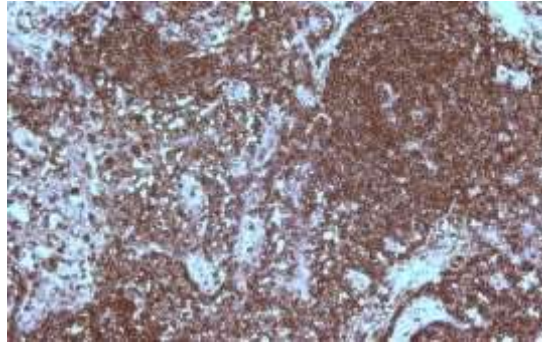


Figura 120 - CD45 (HRP, 100x).

14.1.11 Ki67

Este antígeno é uma proteína nuclear não histona que está presente em todas as fases do ciclo celular exceto G₀ (Figura 121).

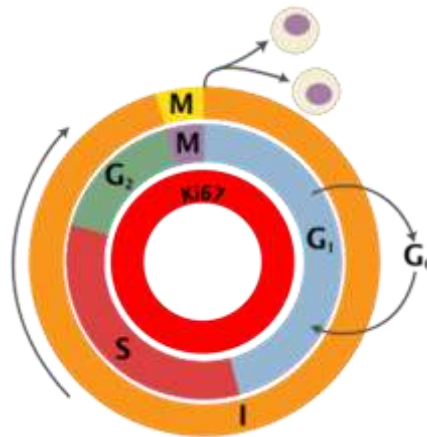


Figura 121 - A célula expressa Ki67 ao longo de todo o Ciclo celular, exceto na fase G₀

Este antígeno torna-se assim num excelente identificador de células em fase ativa e proliferativa, contribuindo para o estabelecimento do prognóstico em diversas neoplasias¹⁵³ (Figura 122).

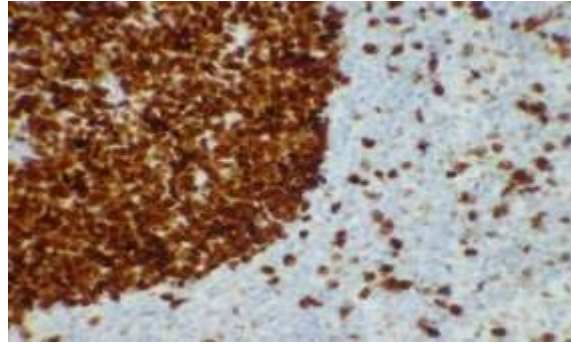


Figura 122 - Ki67 (HRP, 100x).

14.1.12 Proteína S100

O anticorpo anti-S100 permite identificar células que expressam esta proteína, sendo uma ferramenta útil na identificação de várias patologias, tais como: melanoma, histiocitose de Langerhans, condroblastoma e schwannoma.

A S100 é uma família de multigenes de baixo peso molecular, sendo composta por 19 membros que são diferencialmente expressos num grande número de tipos celulares que vão desde as células gliais do sistema nervoso central e periférico, condrócitos e adipócitos, até às células epiteliais das glândulas salivares e células renais¹⁵⁴.

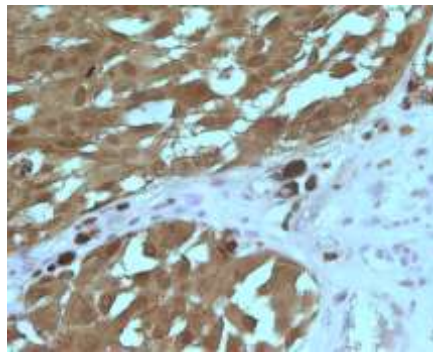


Figura 123 - Proteína S100 (HRP, 400x).

14.1.13 Cadeias leves Kappa e Lambda

Os plasmócitos e outros tipos de células B expressam cadeias leves do tipo Kappa ou lambda, normalmente numa proporção de 2/3 e 1/3, respetivamente. Tendo em conta que uma célula só expressa um tipo de cadeia leve, estes marcadores podem ser utilizados em conjunto para distinguir entre populações linfocitárias policlonais (fisiológicas) e populações monoclonais (neoplásicas)¹⁵⁰ (Figura 124 e Figura 125).

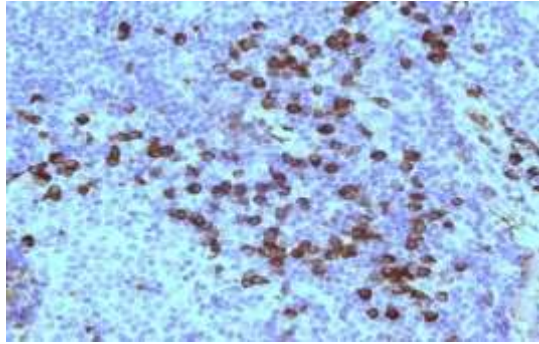


Figura 124 - CL Kappa (HRP, 100x).

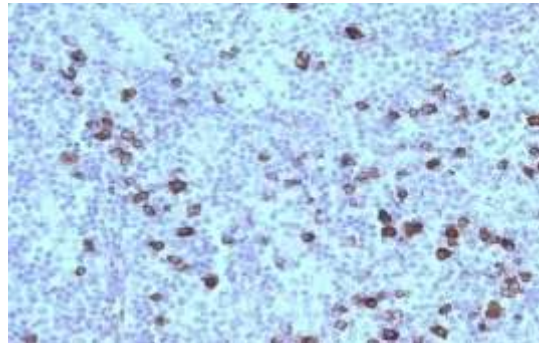


Figura 125 - CL lambda (HRP, 100x).

14.1.14 Vimentina

A vimentina é um filamento intermédio de 57 kDa que pertence à classe III destes filamentos, integrando o citoesqueleto das células de vertebrados. O anticorpo anti-vimentina é utilizado para identificar células de origem mesenquimatosa em tecidos normais e neoplásicos¹⁵⁵ (Figura 126).

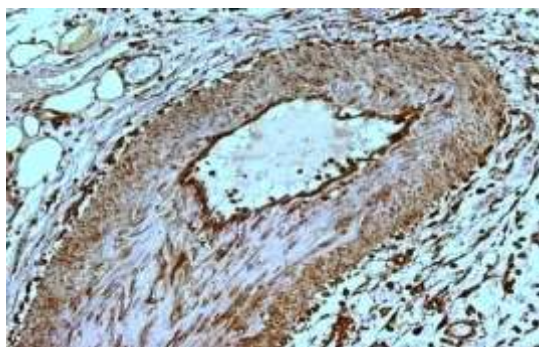


Figura 126 - Vimentina (HRP, 100x).

14.1.15 Citoqueratina 7

A citoqueratina 7 é uma citoqueratina básica encontrada na maioria dos epitélios transicionais e glandulares. A sua marcação é maioritariamente utilizada para dis-

tinguir a origem dos carcinomas, uma vez que é expressa no epitélio de ovário, pulmão e mama mas não no epitélio de cólon, próstata ou trato gastrointestinal¹⁵⁶ (Figura 127).

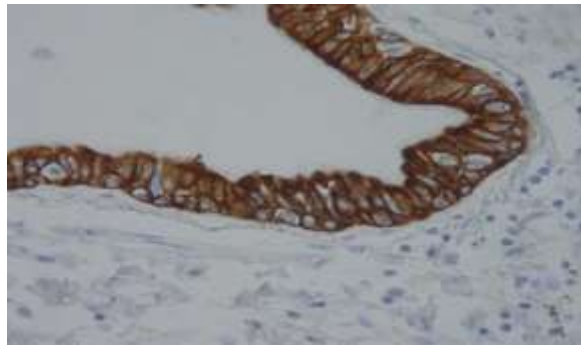


Figura 127 - Citoqueratina 7 (HRP, 400x).

14.1.16 Citoqueratinas (clones AE1/AE3)

Este soro monoclonal, que corresponde a uma imunoglobulina de classe IgG1, é produzido por imunização de ratinho e permite identificar filamentos de citoqueratina que proporcionam integridade estrutural às células epiteliais. Normalmente as citoqueratinas de baixo peso molecular são expressas na fase inicial do desenvolvimento das células, enquanto as de alto peso molecular são expressas em células maduras. O clone AE1 marca a maioria dos epitélios e serve como triagem geral para neoplasias epiteliais, apresentando uma marcação seletiva para a camada basal da epiderme e do epitélio esofágico, não marcando as células parenquimatosas do fígado e pâncreas. O clone AE3 marca todo o epitélio da maioria dos tecidos: pele, esôfago, bexiga e também ductos e células do parênquima pancreático. Assim sendo, este anticorpo permite diferenciar tumores epiteliais (carcinomas) de tumores não epiteliais (linfomas ou sarcomas). Pode também ser utilizado para caracterizar a origem epitelial de tumores adenomatóides, para distinguir carcinomas indiferenciados de linfomas de grandes células e para distinguir carcinoma indiferenciado de melanoma, quando combinado com o anticorpo para a proteína S100⁶⁹ (Figura 128).

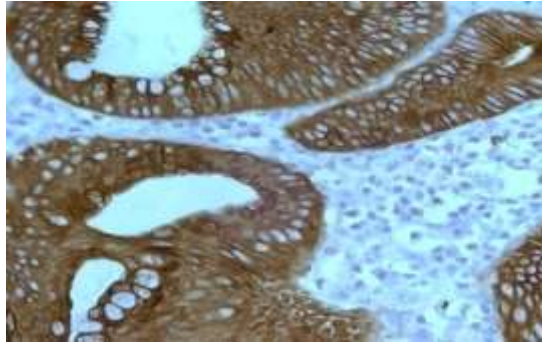


Figura 128 - Citoqueratina (clones AE1/AE3) (HRP, 400x).

14.1.17 Actina do Músculo Liso

A actina é um componente muito importante do citoesqueleto que se encontra presente em muitos tipos celulares. O anticorpo anti-actina do músculo liso é utilizado para identificar células do músculo liso, miofibroblastos e células mioepiteliais. O clone mais utilizado é o 1A4 e permite o diagnóstico diferencial de leiomiomas, leiomiossarcomas e adenomas pleomórficos. Este anticorpo pode ser usado juntamente com o anticorpo anti-actina muscular para distinguir entre leiomiossarcoma e rabiomiossarcoma⁶⁹ (Figura 129).



Figura 129 - Actina do músculo liso (HRP, 100x).

15 MARCAÇÃO MÚLTIPLA

A múltipla marcação consiste na aplicação de mais de um anticorpo primário num corte durante a técnica imunohistoquímica e consequente identificação dos anti-génios correspondentes. Cada ligação anticorpo-antigénio irá apresentar uma diferente cor que pode ser separadamente identificada.

Esta metodologia possui vantagens do ponto de vista técnico, clínico e financeiro, pois permitem co-localizar diferentes antigénios na mesma célula ou em células adjacentes, em vez de interpretar os resultados provenientes da observação de duas ou mais lâminas individuais. Também é possível a redução do número de lâminas que é necessário analisar e interpretar para validar resultados clínicos ou investigacionais e a diminuição do material histológico/celular despendido para proceder a análises imunohistoquímicas. Além disso, possibilitam a redução dos reagentes utilizados na desparafinação, hidratação, imunomarkação, contraste, desidratação, clarificação e montagem e consequentes resíduos do laboratório¹⁵⁷.

Existem duas formas distintas de aplicar marcação múltipla: método simultâneo e método sequencial¹⁵⁷.

15.1 Método simultâneo

Nesta metodologia de múltipla marcação os anticorpos primários são todos colocados em simultâneo na lâmina, bem como os anticorpos secundários e assim sucessivamente. É necessário que seja feita uma planificação adequada para que não surjam interações indesejadas entre os reagentes utilizados que podem comprometer a especificidade e sensibilidade da marcação imunohistoquímica.

Vantagens:

- Rápida.

Desvantagens:

- Planificação complicada.
- Exigência de reagentes altamente específicos.

15.2 Método sequencial com desnaturação intercalar

Este método implica a realização de uma técnica imunohistoquímica completa, incluindo revelação, seguida de uma desnaturação e posteriormente de nova técnica imunohistoquímica e assim sucessivamente (Figura 130, Figura 131, Figura 132, Figura 133).

A desnaturação tem a função de eliminar todos os reagentes colocados no tecido pela técnica anterior, de forma a deixar o tecido limpo para os novos anticorpos. Pode ser realizada com soluções de baixo pH ou por alta temperatura.

Vantagens:

- Planificação mais simples.
- Não exige reagentes altamente específicos.

Desvantagens:

- Mais demorada e trabalhosa.

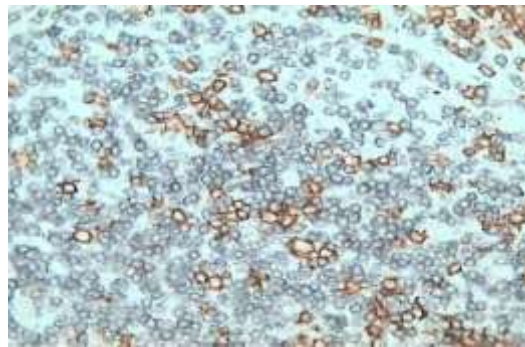


Figura 130 - CD3 (negro) e CD20 (castanho) em gânglio linfático (HRP, 100x).

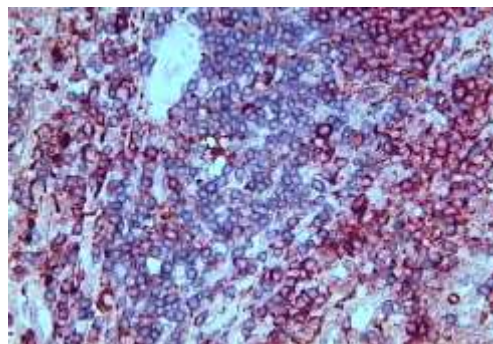


Figura 131 - Glicoforina A (castanho), CD20 (negro) e CD3 (vermelho) em baço (100x).

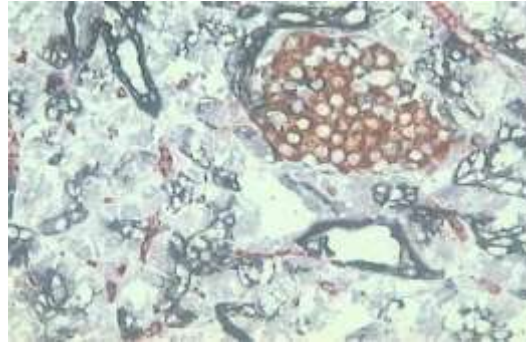


Figura 132 - Insulina (castanho), Citoqueratina (negro) e CD34 (vermelho) em pâncreas (400x).

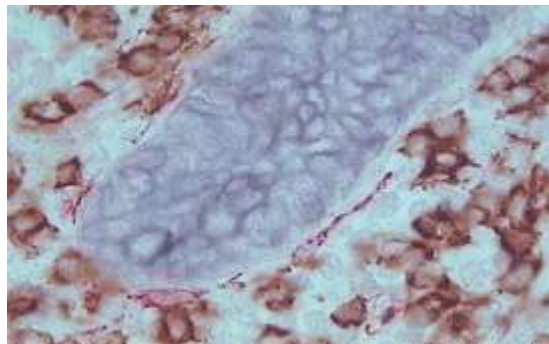


Figura 133 - CD20 (castanho), Citoqueratina (negro) e AML (vermelho) em ap. ileocecal (400x).

16 CONCLUSÃO

Este Manual procura facultar aos Estudante e interessados em imunohistoquímica uma informação atual e aplicada em língua portuguesa. Na sua génese esteve principalmente a experiência profissional do autor e uma revisão bibliográfica que se procurou que fosse adequada. No entanto, muito ficou ainda por dizer e fundamentar, pelo que novas revisões surgirão, dando lugar a novos Manuais, que procurarão ser mais ajustados ao estado-da-arte em vigor.

17 APÊNDICES

17.1 Apêndice 1 - Adesivação de lâminas - APES

1. Colocar as lâminas em acetona - 5 minutos.
2. Secar as lâminas ao ar.
3. Preparar solução APES 2% em acetona.
4. Colocar as lâminas em solução de APES 2% - 30 minutos.
5. Colocar as lâminas em água corrente - 10 minutos.
6. Passagem por água destilada.
7. Deixar secar "overnight", à temperatura ambiente ou a 37°C.

Notas:

- a. APES - 3-AMINOPROPIL-TRIETOXISILANO (Sigma - 440140-500).
- b. A solução de APES pode ser guardada no frigorífico para nova utilização.
- c. Estas lâminas não possuem prazo de validade.

17.2 Apêndice 2 - Tampão EDTA 1 mM pH 8.0

Preparação da Solução Stock 100x concentrada.

1. Juntar 29,2 g de EDTA a 1000 cm³ de água Destilada.
2. Ajustar o pH com NaOH 0.1M para ajudar a dissolução.

Notas:

- a. A solução stock deve se diluída a 1/100 antes da utilização e ajustar o pH com NaOH 0.1M.
- b. Mergulhar as lâminas em 400 ml de solução tampão e colocar no forno microondas durante 15 minutos à potência de 900 w (nunca deixar secar as lâminas).
- c. Após recuperação, arrefecer gradualmente as lâminas em água corrente.

17.3 Apêndice 3 - Tampão citrato, pH 6.0

Para 5000 cm³ de solução:

1. Juntar 10.5g de Ácido Cítrico a 5000 cm³ de água destilada.
2. Acertar o pH a 6.0 com NaOH 2M (aproximadamente 60 cm³).
3. Adicionar 2,5 cm³ de tween 20 e homogeneizar.

17.4 Apêndice 4 - Tampão Tris/EDTA, pH9.0

Para 1000 cm³ de solução:

1. Juntar 1000 cm³ de água destilada a 1,21 g de Tris Base e a 0,37 g de EDTA.
2. Verificar o pH e se necessário corrigir para pH 9, com NaOH 2M.
3. Adicionar 0,5 cm³ de tween 20 e homogeneizar.

17.5 Apêndice 5 - Solução de pepsina 0,4% pH 1/2

1. Dissolver 0,4 g de pepsina em 100 cm³ de água destilada.
2. Adicionar 1 cm³ de Ácido Clorídrico
3. Acertar o pH entre 1 e 2 a 37°C.

Notas:

- a. a solução de pepsina é conservada no congelador e pode ser reutilizada até quatro vezes.
- b. Cada reutilização exige o acerto de pH.
- c. Evitar diluir a solução em cada reutilização.

17.6 Apêndice 6 - Solução de bloqueio da Peroxidase Endógena

1. Medir 100 cm³ de água destilada.
2. Adicionar 3 cm³ de Peróxido de Hidrogénio 30% e homogeneizar.

17.7 Apêndice 7 - Protocolo de Técnica Imunohistoquímica LSAB

1. Desparafinar em xilol - 15 min.
2. Passagem em Álcool 100%.
3. Inibição da Peroxidase endógena em solução de bloqueio - 10 min.
4. Passagem por água corrente.
5. Recuperação antigénica.
6. Lavagem em PBS e colocação de meio hidrófobo em volta do corte.
7. Colocação em soro primário - 30 min.
8. Lavagem em PBS - 2 x 5 min.
9. Colocação em soro secundário biotilado - 30 min.
10. Lavagem em PBS - 2 x 5 min.
11. Colocação em "soro terciário"- streptavidina conjugada com peroxidase - 30 min.

12. Lavagem em PBS - 3 x 5 min.
13. Revelação com solução de DAB - 5 min.
14. Lavagem em água corrente.
15. Contrastar com hematoxilina de Mayer.
16. Desidratar, clarificar e montar.

17.8 Apêndice 8 – Protocolo de Técnica Imunohistoquímica de Polímero Indireto

1. Desparafinar em xilol - 15 min.
2. Passagem em Álcool 100%.
3. Inibição da Peroxidase endógena em solução de bloqueio - 10 min.
4. Passagem por água corrente.
5. Recuperação antigénica.
6. Lavagem em PBS e colocação de meio hidrófobo em volta do corte.
7. Colocação em soro primário - 30 min.
8. Lavagem em PBS - 2 x 5 min.
9. Colocação do Soro polímero indireto - 30 min.
10. Lavagem em PBS - 3 x 5 min.
11. Revelação com solução de DAB - 5 min.
12. Lavagem em água corrente.
13. Contrastar com hematoxilina de Mayer.
14. Desidratar, clarificar e montar.

18 LISTA BIBLIOGRÁFICA

1. Torlakovic EE, Riddell R, Banerjee D, et al. Canadian Association of Pathologists–Association canadienne des pathologistes National Standards Committee/Immunohistochemistry Best Practice Recommendations for Standardization of Immunohistochemistry Tests. *Am. J. Clin. Pathol.* 2010;133(3):354-365. doi:10.1309/AJCPDYZ1XMF4HJWK.
2. Harlow E. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999.
3. Polak JM, Van Noorden S. *Introduction to Immunocytochemistry*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2003.
4. True L. *Atlas of Diagnostic Immunohistopathology*. Philadelphia; New York: Lippincott ; Gower Medical Pub.; 1990.
5. Dako. *Immunohistochemical Staining Methods*. 6^a edição. (Kumar G, Rudbeck L, eds.). Carpinteria: Dako; 2013.
6. Werner M, Von Wasielewski R, Komminoth P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem. Cell Biol.* 1996;105(4):253-260.
7. Werner M. Tissue fixation and antigen retrieval. *Rev Esp Patol* 1999;32(3):355-361.
8. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am. J. Surg. Pathol.* 2000;24(7):1016-1019.
9. Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet. Pathol. Online* 2005;42(4):405-426. doi:10.1354/vp.42-4-405.
10. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 1941;47(2):200-202. doi:10.3181/00379727-47-13084P.
11. The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *J. Immunol.* 1942;45(3):159-170.
12. Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 1966;14(12):929-931.
13. Mason DY, Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J. Clin. Pathol.* 1978;31(5):454-460.
14. Carson FL, Hladik C. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. 3rd Edition. Chicago: American Society for Clinical Pathology; 2009.

15. Singer SJ, Schick AF. The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961;9(3):519-537.
16. Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 1971;8(11):1081-1083.
17. Delves PJ, Roitt IM, eds. *Roitt's Essential Immunology*. 12th ed. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2011.
18. Hay FC, Westwood OMR, Nelson PN, Hudson L. *Practical Immunology*. Malden, MA: Blackwell Science; 2002.
19. Mak TW, Saunders ME. *Primer to The Immune Response*. Amsterdam; Boston: Elsevier; 2011.
20. Copstead LE, Banasik JL. *Pathophysiology*. St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier; 2010.
21. Bloch DR. *Organic Chemistry Demystified*. New York: McGraw-Hill; 2006. Available at: <http://site.ebrary.com/id/10155018>. Accessed August 8, 2012.
22. Vilches-Moure JG, Ramos-Vara JA. Comparison of rabbit monoclonal and mouse monoclonal antibodies in immunohistochemistry in canine tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005;17(4):346.
23. Brumbaugh K, Johnson W, Liao W-C, et al. Overview of the Generation, Validation, and Application of Phosphosite-Specific Antibodies. In: Kalyuzhny AE, ed. *Signal Transduction Immunohistochemistry*. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2011:3-43.
24. Cole SP, Campling BG, Atlaw T, Kozbor D, Roder JC. Human monoclonal antibodies. *Mol. Cell. Biochem.* 1984;62(2):109-120.
25. Nobelprize.org. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984. *Nobel Media AB 2013* 2013. Available at: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/>.
26. Kozbor D, Roder JC, Chang TH, Steplewski Z, Koprowski H. Human anti-tetanus toxoid monoclonal antibody secreted by EBV-transformed human B cells fused with murine myeloma. *Hybridoma* 1982;1(3):323-328.
27. Steinitz M, Klein G, Koskimies S, Makel O. EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature* 1977;269(5627):420-422.
28. Huse WD, Sastry L, Iverson SA, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* 1989;246(4935):1275-1281.
29. Siegel DL. Recombinant monoclonal antibody technology. *Transfus. Clin. Biol. J. Société Fr. Transfus. Sang.* 2002;9(1):15-22.

30. Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K. A New Mouse Myeloma Cell Line that Has Lost Immunoglobulin Expression but Permits the Construction of Antibody-Secreting Hybrid Cell Lines. *J. Immunol.* 1979;123(4):1548-1550.
31. Galfrè G, Milstein C, Wright B. Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. *Nature* 1979;277(5692):131-133.
32. Galfrè G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* 1981;73(Pt B):3-46.
33. Van Zeeland AA, de Ruijter CE, Simons JW. The role of 8-azaguanine in the selection from human diploid cells of mutants deficient in hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase (HGPRT). *Mutat. Res.* 1974;24(1):55-68.
34. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010.
35. Renner JC. Monoclonal antibody production in ascites fluid. *J. Tissue Cult. Methods* 1985;9(3):187-189. doi:10.1007/BF01665931.
36. abcam.com/technical. Antibody storage Guide. 2014. Available at: http://docs.abcam.com/pdf/protocols/Antibody_Storage-Guide.pdf.
37. Wear JO. Azide hazards with automatic blood cell counters. *J. Chem. Educ.* 1975;52(1):A23-25.
38. Robertson D, Savage K, Reis-Filho JS, Isacke CM. Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol.* 2008;9:13. doi:10.1186/1471-2121-9-13.
39. Robertson D, Isacke CM. Multiple immunofluorescence labeling of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2011;724:69-77. doi:10.1007/978-1-61779-055-3_4.
40. McCluskey RT. The value of immunofluorescence in the study of human renal disease. *J. Exp. Med.* 1971;134(3):242-255.
41. Qu Z, Cui Z, Liu G, Zhao M. The distribution of IgG subclass deposition on renal tissues from patients with anti-glomerular basement membrane disease. *BMC Immunol.* 2013;14:19. doi:10.1186/1471-2172-14-19.
42. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society, Cattran DC, Coppo R, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney Int.* 2009;76(5):534-545. doi:10.1038/ki.2009.243.
43. Price NC. *Fundamentals of Enzymology: The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins*. 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 1999.
44. Fischer E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* 1894;27(3):2985-2993. doi:10.1002/cber.18940270364.

45. Fischer E. Ueber die optischen Isomeren des Traubenzuckers, der Gluconsäure und der Zuckersäure. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* 1890;23(2):2611-2624. doi:10.1002/cber.189002302157.
46. Koshland DE. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1958;44(2):98-104.
47. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. *Enzyme Nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. San Diego: Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press; 1992.
48. O'Leary TJ, Becker, Frisman DM. *Advanced Diagnostic Methods in Pathology: Principles, Practice, and Protocols*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2003.
49. Mogharrab N, Ghourchian H, Amininasab M. Structural Stabilization and Functional Improvement of Horseradish Peroxidase upon Modification of Accessible Lysines: Experiments and Simulation. *Biophys. J.* 2007;92(4):1192-1203. doi:10.1529/biophysj.106.092858.
50. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed. London [etc.]: Churchill Livingstone; 2008.
51. Hayat MA, Hayat MA. *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods : For Light and Electron Microscopy*. New York: Kluwer Academic/Plenum Pub; 2002.
52. Corfield AP, ed. *Glycoprotein Methods and Protocols: The Mucins*. Totowa, N.J: Humana Press; 2000.
53. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *J. Histochem. Cytochem.* 1997;45(3):327-343. doi:10.1177/002215549704500301.
54. Bratthauer GL. The Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Method. In: Javois LC, ed. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 1995:165-173.
55. Heggeness MH, Ash JF. Use of the avidin-biotin complex for the localization of actin and myosin with fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 1977;73(3):783-788.
56. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 1981;29(4):577-580.
57. Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 1981;29(11):1349-1353.

58. DeLange RJ, Huang TS. Egg white avidin. 3. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit. *J. Biol. Chem.* 1971;246(3):698-709.
59. Wallén MJ, Laukkanen MO, Kulomaa MS. Cloning and sequencing of the chicken egg-white avidin-encoding gene and its relationship with the avidin-related genes Avr1-Avr5. *Gene* 1995;161(2):205-209.
60. Laitinen OH, Hytönen VP, Ahlroth MK, et al. Chicken avidin-related proteins show altered biotin-binding and physico-chemical properties as compared with avidin. *Biochem. J.* 2002;363(Pt 3):609-617.
61. Laitinen OH, Hytönen VP, Nordlund HR, Kulomaa MS. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 2006;63(24):2992-3017. doi:10.1007/s00018-006-6288-z.
62. Laitinen OH, Nordlund HR, Hytönen VP, Kulomaa MS. Brave new (strept)avidins in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2007;25(6):269-277. doi:10.1016/j.tibtech.2007.04.001.
63. Green NM. Avidin. 3. The nature of the biotin-binding site. *Biochem. J.* 1963;89(3):599-609.
64. Green NM, Toms EJ. The dissociation of avidin-biotin complexes by guanidinium chloride. *Biochem. J.* 1972;130(3):707-711.
65. Yamada H, Sano Y. The biotinylation of the rabbit serotonin antibody and its application to immunohistochemical studies using the two-step ABC method. *Histochemistry* 1985;83(4):285-289.
66. Katchalski E, Goldstein L, Levin Y, Blumberg S. United States Patent: 3650901 - Polymeric Enzyme products. 1972. Available at: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect2=PTO1&Sect2=HITOFF&p=1&u=/netahtml/PTO/search-bool.html&r=1&f=G&l=50&d=PALL&RefSrch=yes&Query=PN/3650901>.
67. Winther L, Lohse J, Gabs S, Petersen K. Immunohistochemistry Detection Method. 2007. Available at: <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007023390>. Accessed October 6, 2013.
68. Freytag JW, Ishikawa E. Immunoassays utilizing covalent conjugates of polymerized enzyme and antibody. 1986.
69. Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry, 2e.* 2nd ed. Churchill Livingstone; 2006.
70. Skaland I, Nordhus M, Gudlaugsson E, et al. Evaluation of 5 different labeled polymer immunohistochemical detection systems. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM Off. Publ. Soc. Appl. Immunohistochem.* 2010;18(1):90-96. doi:10.1097/PAI.0b013e3181b0eaad.

71. Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratory*. Humana Press: Totowa, N.J.; 2006.
72. Bricca GM, Brodland DG, Zitelli JA. Immunostaining melanoma frozen sections: the 1-hour protocol. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al* 2004;30(3):403-408.
73. Abir F, Barkhordarian S, Sumpio BE. Efficacy of dextran solutions in vascular surgery. *Vasc. Endovascular Surg.* 2004;38(6):483-491.
74. Zevenhuizen LPTM. Cell-bound exodextranase of bacillus species. *Carbohydr. Res.* 1968;6(3):310-318. doi:10.1016/S0008-6215(00)81452-4.
75. Khalikova E, Susi P, Korpela T. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005;69(2):306-325. doi:10.1128/MMBR.69.2.306-325.2005.
76. Bisgaard K, Lihme A, Rolsted H. Polymeric conjugates for enhanced signal generation in enzyme immunoassays. 1993.
77. Shan-Rong Shi JG. Sensitivity and Detection Efficiency of a Novel Two-Step Detection System (PowerVision) for Immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem. Amp Mol. Morphol.* 1999;7(3):201.
78. Petrosyan K, Tamayo R, Joseph D. Sensitivity of a novel Biotin-free detection reagent (PowerVision+) for immunohistochemistry. *J. Histotechnol.* 2002;25:247-250.
79. Rocha RM, Miller K, Soares F, Schenka N, Vassallo J, Gobbi H. Biotin-free systems provide stronger immunohistochemical signal in oestrogen receptor evaluation of breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2009;62(8):699-704. doi:10.1136/jcp.2009.065326.
80. Rocha RM, Miller K, Soares F, Vassallo J, Shenka N, Gobbi H. The use of the immunohistochemical biotin-free visualization systems for estrogen receptor evaluation of breast cancer. *Appl Cancer Res* 2009;29(3):112-117.
81. National Health Museum. Techniques Lab A: Manipulating Small Volumes. *Tech. Lab Manip. Small Vol.* Available at: <http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/geneconn/smallvol/part1.php>.
82. Shi S-R, Taylor CR. *Antigen Retrieval Immunohistochemistry Based Research and Diagnostics*. Hoboken, N.J.: Wiley; 2010.
83. National Toxicology Program. *Report on Carcinogens*. Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program; 2011:499. Available at: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/roc12.pdf>.
84. Shi SR, Cote RJ, Hawes D, et al. Calcium-induced modification of protein conformation demonstrated by immunohistochemistry: What is the signal? *J. Histochem. Cytochem.* 1999;47(4):463.

85. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 1991;39(6):741-748.
86. Battifora H, Alsabeh R, Jenkins K, Gown A. Epitope Retrieval (unmasking) in Immunohistochemistry. In: Weinstein RS, Graham AR, M. D., Anderson RE, et al., eds. *Advances in Pathology and Laboratory Medicine*. Mosby-Year Book; 1996.
87. Burns J, Hambridge M, Taylor CR. Intracellular immunoglobulins A comparative study on three standard tissue processing methods using horseradish peroxidase and fluorochrome conjugates. *J. Clin. Pathol.* 1974;27(7):548-557. doi:10.1136/jcp.27.7.548.
88. Huang SN, others. Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 1975;33(1):88.
89. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Techniques Current Perspectives. *J. Histochem. Cytochem.* 2001;49(8):931-937. doi:10.1177/002215540104900801.
90. Fraenkel-Conrat H, Cooper M, Olcott HS. The Reaction of Formaldehyde with Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 1945;67(6):950-954. doi:10.1021/ja01222a023.
91. Leong ASY, Milios J, Leong FJWM. Epitope retrieval with microwaves. A comparison of citrate buffer and EDTA with three commercial retrieval solutions. *Appl. Immunohistochem.* 1996;(4):201-207.
92. Kawai K, Serizawa A, Hamana T, Tsutsumi Y. Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol. Int.* 1994;44(10-11):759-764. doi:10.1111/j.1440-1827.1994.tb02923.x.
93. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J. Pathol.* 1993;171(2):83-98. doi:10.1002/path.1711710205.
94. Shi SR, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 1995;43(2):193-201.
95. Morgan JM, Navabi H, Jasani B. Role of Calcium chelation in high-temperature antigen retrieval at different pH values. *J. Pathol.* 1997;182(2):233-237. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199706)182:2<233::AID-PATH827>3.0.CO;2-Y.
96. Morgan JM, Navabi H, Schmid KW, Jasani B. Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval. *J. Pathol.* 1994;174(4):301-307. doi:10.1002/path.1711740410.

97. Bankfalvi A, Navabi H, Bier B, Böcker W, Jasani B, Schmid KW. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J. Pathol.* 1994;174(3):223–228. doi:10.1002/path.1711740312.
98. Igarashi H, Sugimura H, Maruyama K, et al. Alteration of immunoreactivity by hydrated autoclaving, microwave treatment, and simple heating of paraffin-embedded tissue sections. *APMIS* 1994;102(1-6):295–307. doi:10.1111/j.1699-0463.1994.tb04879.x.
99. Umemura S, Kawai K, Osamura RY, Tsutsumi Y. Antigen retrieval for bcl-2 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol. Int.* 1995;45(2):103–107. doi:10.1111/j.1440-1827.1995.tb03429.x.
100. Pons C, Costa I, Von Schilling B, Matias-Guiu B, Prat J. Antigen Retrieval by Wet Autoclaving for p53 Immunostaining. *Appl. Immunohistochem.* 1995;3(4):265-267.
101. Norton AJ, Jordan S, Yeomans P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J. Pathol.* 1994;173(4):371-379. doi:10.1002/path.1711730413.
102. Miller RT, Estran C. Heat-induced epitope retrieval with a pressure cooker - suggestions for optimal use. *Appl Immunohistochem* 1995;3:190-193.
103. Pasha T, Montone K, Tomaszewski J. Nuclear antigen retrieval utilizing steam heat. 1995;72:167A.
104. Taylor CR, Chen C, Shi SR, Yang C, Cote RJ. A comparative study of antigen retrieval heating methods. *CAP Today* 1995;9:16–22.
105. Berenstein D, Rozali M. Everyday physics: pressure cookers. *Shores Dirac Sea*. Available at: <http://diracseashore.wordpress.com/2008/09/17/everyday-physics-pressure-cookers/>. Accessed September 10, 2014.
106. Nadji M. The potential value of immunoperoxidase techniques in diagnostic cytology. *Acta Cytol.* 1980;24(5):442-447.
107. Chess Q, Hajdu SI. The role of immunoperoxidase staining in diagnostic cytology. *Acta Cytol.* 1986;30(1):1-7.
108. Koss LG. The future of cytology. The Wachtel lecture for 1988. *Acta Cytol.* 1990;34(1):1-9.
109. Flens MJ, van der Valk P, Tadema TM, et al. The contribution of immunocytochemistry in diagnostic cytology. Comparison and evaluation with immunohistology. *Cancer* 1990;65(12):2704-2711.
110. Fowler LJ, Lachar WA. Application of immunohistochemistry to cytology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008;132(3):373-383. doi:10.1043/1543-2165(2008)132[373:AOITC]2.0.CO;2.

111. Fadda G, Rossi ED, Mulè A, Miraglia A, Vecchio FM, Capelli A. Diagnostic efficacy of immunocytochemistry on fine needle aspiration biopsies processed by thin-layer cytology. *Acta Cytol.* 2006;50(2):129-135.
112. Burry RW. *Immunocytochemistry. A Practical Guide for Biomedical Research.* New York; London: Springer; 2010.
113. Koss LG, Melamed MR, eds. *Koss' Diagnostic Cytology And Its Histopathologic Bases 2 Vol. Set.* 5^a ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
114. Dagg B, Eustace DL, Han X, Money S, Heyderman E. Cytoblock preparations for examination of cervical and other cells. *J. Clin. Pathol.* 1992;45(12):1122-1123.
115. Ghosh I, Dey SK, Das A, Bhattacharjee D, Gangopadhyay S. Cell block cytology in pleural effusion. *J. Indian Med. Assoc.* 2012;110(6):390-392, 396.
116. Leong AS-Y, Suthipintawong C, Vinyuvat S. Immunostaining of Cytologic Preparations: A Review of Technical Problems. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 1999;7(3).
117. Crapanzano JP, Heymann JJ, Monaco S, Nassar A, Saqi A. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *CytoJournal* 2014;11:7. doi:10.4103/1742-6413.129187.
118. Barata C, Anágua M, Roque R, Borges-Ferro A. Imunocitoquímica em amostras brônquicas processadas em ThinPrepTM: comparação de três métodos de pós-fixação. *NewsLab* Aguarda Publicação.
119. Hoda RS, Loukeris K, Abdul-Karim FW. Gynecologic cytology on conventional and liquid-based preparations: a comprehensive review of similarities and differences. *Diagn. Cytopathol.* 2013;41(3):257-278. doi:10.1002/dc.22842.
120. Dabbs DJ, Abendroth CS, Grenko RT, Wang X, Radcliffe GE. Immunocytochemistry on the Thinprep processor. *Diagn. Cytopathol.* 1997;17(5):388-392.
121. Nathan NA, Narayan E, Smith MM, Horn MJ. Cell Block Cytology Improved Preparation and Its Efficacy in Diagnostic Cytology. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000;114(4):599-606.
122. Shivakumarswamy U, Arakeri SU, Karigowdar MH, Yelikar B. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology. *J. Cytol. Indian Acad. Cytol.* 2012;29(1):11-15. doi:10.4103/0970-9371.93210.
123. Shidham VB, Chang C-C, Rao RN, Komorowski R, Chivukula M. Immunostaining of cytology smears: a comparative study to identify the most suitable method of smear preparation and fixation with reference to commonly used immunomarkers. *Diagn. Cytopathol.* 2003;29(4):217-221. doi:10.1002/dc.10364.

124. O'Leary TJ, Fowler CB, Evers DL, Mason JT. Protein fixation and antigen retrieval: chemical studies. *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.* 2009;84(5):217-221. doi:10.3109/10520290903039086.
125. Bancroft JD, Floyd AD, Suvana SK. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7th ed. Oxford: Churchill Livingstone Elsevier; 2013.
126. Suthipintawong C, Leong AS, Vinyuvat S. Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn. Cytopathol.* 1996;15(2):167-174. doi:10.1002/(SICI)1097-0339(199608)15:2<167::AID-DC17>3.0.CO;2-F.
127. Liu J, Farhood A. Immunostaining for thyroid transcription factor-1 on fine-needle aspiration specimens of lung tumors: a comparison of direct smears and cell block preparations. *Cancer* 2004;102(2):109-114. doi:10.1002/cncr.20110.
128. Dunstan RW, Wharton KA Jr, Quigley C, Lowe A. The use of immunohistochemistry for biomarker assessment--can it compete with other technologies? *Toxicol. Pathol.* 2011;39(6):988-1002. doi:10.1177/0192623311419163.
129. Barnes DM, Harris WH, Smith P, Millis RR, Rubens RD. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 1996;74(9):1445-1451.
130. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 1998;11(2):155-168.
131. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001;25(9):1204-1207.
132. Leake R. Detection of the oestrogen receptor (ER). immunohistochemical versus cytosol measurements. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 2000;36 Suppl 4:S18-19.
133. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1999;17(5):1474-1481.
134. Naomar de Almeida Filho. *Introdução à epidemiologia moderna*. Belo Horizonte; Salvador; Rio de Janeiro: COOPMED Editora ; APCE Produtos do Conhecimento ; ABRASCO; 1992.
135. Ventana. Site corporativo de apresentação do Ventana Ultra. Available at: <http://www.ventana.com/benchmarkultra/>. Accessed September 10, 2014.
136. Leica Biosystems. Site corporativo de apresentação do Leica Bond III. Available at: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/advanced-staining-instruments/details/product/leica-bond-iii/>. Accessed September 10, 2014.

137. Andersen J, Poulsen HS. Immunohistochemical estrogen receptor determination in paraffin-embedded tissue. Prediction of response to hormonal treatment in advanced breast cancer. *Cancer* 1989;64(9):1901-1908.
138. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365(9472):1687-1717. doi:10.1016/S0140-6736(05)66544-0.
139. Reiner A, Neumeister B, Spona J, Reiner G, Schemper M, Jakesz R. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res.* 1990;50(21):7057-7061.
140. American Society of Clinical Oncology. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1996;14(10):2843-2877.
141. Soussi T. Focus on the p53 gene and cancer: Advances in TP53 mutation research. *Hum. Mutat.* 2003;21(3):173-175. doi:10.1002/humu.10191.
142. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod. Pathol.* 2011;24(9):1248-1253. doi:10.1038/modpathol.2011.85.
143. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(31):3997-4013. doi:10.1200/JCO.2013.50.9984.
144. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, et al. 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.* 2006;25(1):118-145. doi:10.1200/JCO.2006.09.2775.
145. Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89(10):4285-4289.
146. Vu T, Claret FX. Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer. *Front. Oncol.* 2012;2. doi:10.3389/fonc.2012.00062.
147. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br. J. Cancer* 2006;94(2):259-267. doi:10.1038/sj.bjc.6602930.
148. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 1998;16:395-419. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.395.

149. Ott G, Rosenwald A. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma. *Haematologica* 2008;93(12):1773-1776. doi:10.3324/haematol.2008.001495.
150. Rehg JE, Bush D, Ward JM. The Utility of Immunohistochemistry for the Identification of Hematopoietic and Lymphoid Cells in Normal Tissues and Interpretation of Proliferative and Inflammatory Lesions of Mice and Rats. *Toxicol. Pathol.* 2012;40(2):345-374. doi:10.1177/0192623311430695.
151. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Saunders; 2011.
152. Hsu J-D, Yao C-C, Lee M-Y, et al. True cytokeratin 8/18 immunohistochemistry is of no use in distinguishing between primary endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* 2010;29(3):282-289. doi:10.1097/PGP.0b013e3181c043bc.
153. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 2000;182(3):311-322. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
154. Ilg EC, Schäfer BW, Heizmann CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 1996;68(3):325-332. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19961104)68:3<325::AID-IJC10>3.0.CO;2-7.
155. Osborn M, Debus E, Weber K. Monoclonal antibodies specific for vimentin. *Eur. J. Cell Biol.* 1984;34(1):137-143.
156. Ramaekers F, van Niekerk C, Poels L, et al. Use of monoclonal antibodies to keratin 7 in the differential diagnosis of adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.* 1990;136(3):641-655.
157. Myers J. The Technical, Clinical and Financial benefits of Multiantigen Immunostaining (MAIS) Procedures. Sakura, ed. *Histologic* 2006;XXXIX(2):25-29.

