

UTILIZAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MAYARA CLEPF BAILONI SANTOS¹, CAROLINA DIAS DE CAMPOS SANCHES², HELDER ESTEVES THOMÉ

¹ Graduandos do Curso de Medicina Veterinária - UNIFEOB, São João da Boa Vista/SP.

² Residente do laboratório de Patologia Veterinária – UNIFEOB, São João da Boa Vista/SP.

³ Professor da disciplina de Patologia Veterinária Faj e UNIFEOB, São João da Boa Vista/SP.

RESUMO

A imunohistoquímica é utilizada na rotina diagnóstica humana desde a década de 70 e, recentemente, vem sendo introduzida na medicina veterinária, porém com o uso ainda limitado devido a falta de anticorpos específicos para os tecidos animais, utilizando assim anticorpos que apresentam reatividade cruzada entre antígenos humanos e animais. Esta técnica tem por finalidade visualizar na célula a distribuição de moléculas de anticorpos marcados com substâncias fluocrômicas (imunofluorescência), anticorpos associados a enzimas (peroxidase) ou radioativos (auto-radiografia). Para um diagnóstico conclusivo, com qualidade e utilidade, deve se inserir o exame imunohistoquímico num contexto clínico-morfológico adequado, deve se fazer a seleção de anticorpos ideais e protocolos padronizados de reações, deve se associar as informações clínicas e dados de exames complementares, permitindo ao patologista uma análise minuciosa do caso. Dentre as principais indicações deste exame, encontra-se a tentativa de classificação histogenética de neoplasias com aspectos indiferenciados em lâminas de rotina, para que possa se aplicar esquemas de tratamento mais adequados a estes casos. Esta revisão de literatura tem por objetivo apresentar as características do exame imunohistoquímico, bem como a sua utilização na medicina veterinária para diagnóstico de neoplasias.

PALAVRAS-CHAVE: histogenética, imunohistoquímica, neoplasias indiferenciadas, diagnóstico.

INTRODUÇÃO

A técnica de imunohistoquímica é usada na rotina diagnóstica e na pesquisa em patologia humana desde 1970, porém seu uso na patologia veterinária é relativamente recente, principalmente com objetivo diagnóstico. A maior dificuldade no uso da imunohistoquímica na patologia veterinária tem sido a falta de anticorpos específicos para os tecidos animais. Na falta de anticorpos específicos para as espécies domésticas, a patologia veterinária frequentemente faz uso de anticorpos que apresentam reatividade cruzada entre antígenos humanos e animais (RUIZ, 2005).

A imunohistoquímica tornou-se um método auxiliar de diagnóstico de extrema importância e utilidade. A técnica envolve uma grande gama de anticorpos com origens variadas, utilizados sob condições não uniformemente estabelecidas e em uma variedade de não solucionados (BARRA, 2006).

O princípio básico da imunohistoquímica refere-se à nossa capacidade de desenvolver anticorpos específicos para proteínas estranhas ao organismo, às quais irão se ligar visando sua posterior destruição, representando este a base de nossa defesa imunológica. Em consequência de sua ação altamente específica para cada proteína são estes anticorpos denominados como monoclonais. A obtenção de anticorpos monoclonais contra nossas próprias proteínas resulta da inoculação destas em cobaias como ratos ou coelhos, sendo estes anticorpos posteriormente isolados do sangue destes animais (PINHO, 2005).

Todo exame imunohistoquímico, para garantir sua qualidade e utilidade, deve ser baseado em certas premissas: correta indicação dos casos para o exame, num contexto clínico-morfológico adequado, sabendo-se antemão as vantagens e os limites do método; a seleção dos anticorpos a serem utilizados, baseada sempre numa análise criteriosa dos aspectos clínico-morfológicos do

caso em questão e com avaliação custo/benefício; protocolo padronizado de reações ; interpretação dos resultados pelo médico patologista, a qual deve ter como base informações clínicas completas, dados de exames complementares e uma análise criteriosa dos aspectos morfológicos da lesão examinada (BARRA, 2006).

A técnica de imunohistoquímica tem por finalidade visualizar diretamente na célula a distribuição de moléculas de anticorpos marcados. O marcador pode ser fluorescente (imunofluorescência) e enzimático (peroxidase ou fosfatase alcalina) (TOLOSA,2003).

A sensibilidade e a especificidade em procedimentos de imunohistoquímica têm aspectos próprios. A sensibilidade é a capacidade do teste em produzir o resultado desejado, e há dois componentes a serem avaliados: no anticorpo a identificação da percentagem de resultados positivos verdadeiros e no método o mínimo detectável de antígeno na lâmina. A especificidade (capacidade do teste em detectar positivos verdadeiros e não falsos negativos) é afetada por duas variáveis: fixação e processamento do tecido e a metodologia usada (Barra, 2006).

Durante o exame de imunohistoquímica estes anticorpos monoclonais são adicionados ao tecido contido em um corte histológico fixado em lâmina, no qual irão identificar e fixar-se às moléculas da proteína em questão. Para que tais complexos anticorpo-proteína sejam visualizados são ainda adicionados corantes com a capacidade de ligar-se a estes. Como resultados teremos a demonstração à microscopia ótica da quantidade de moléculas que procuramos visualizar, assim como seu posicionamento na célula, seja este na membrana celular, citoplasma ou núcleo (Pinho,2005).

TIPOS DE TÉCNICAS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

1.1- Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência envolve o uso de anticorpos marcados com substâncias fluocrômicas para determinar a presença de antígenos em preparados histológicos teciduais fixados ou não. A fluorescência é a mais utilizada, dando uma cor verde-amarela, bem como a rodamina, com cor vermelha. Ambas podem ser conjugadas a imunoglobulinas (Tolosa,2003).

Esta reação de imunofluorescência pode ser direta ou indireta. A reação direta utiliza um anticorpo conjugado com substância fluocrômica. Esse método é empregado para detecção de imunoglobulinas nos tecidos. A reação indireta usa um anticorpo primário não conjugado contra o antígeno que se quer revelar no tecido. Para localização desse anticorpo utiliza-se um anticorpo secundário marcado com substância fluocrômica dirigido contra o anticorpo primário. Esse método apresenta a vantagem de poder empregar muitos anticorpos primários e mesmo anticorpo secundário, ou seja, não é necessário que o anticorpo primário seja conjugado (Tolosa,2003).

1.2- Imunoperoxidase

Nessa técnica utiliza-se um anticorpo conjugado a uma enzima para detectar o antígeno. A enzima é localizada pela reação com um substrato invisível que produz um produto insolúvel visível. Este pode ser observado sob microscopia de luz convencional ou eletroônica. A principal vantagem do método enzimático em relação ao fluorescente é que a identificação das células é mais fácil e pode-se observar a estrutura tecidual da base. A desvantagem é que existe peroxidase endógena nos tecidos que pode dar uma reação de fundo. Tanto a técnica direta, quanto a indireta podem ser empregadas, porém a indireta é recomendada com auxílio do sistema de avidina-biotina. Essa modificação emprega a alta afinidade e a interação entre a biotina (vitamina de baixo peso molecular) e a avidina (proteína da clara do ovo). O primeiro anticorpo não conjugado é específico ao antígeno que se deseja localizar. O segundo anticorpo contra o anticorpo primário é conjugado com a avidina-biotina ou streptavidina-biotina (Tolosa,2003).

As técnicas que utilizam enzimas (peroxidase) como marcador geralmente tem custo menos elevado, sendo possível a visualização do agente mesmo quando este se apresenta fragmentado ou em presença de outras bactérias, desde que a fixação tenha sido feita de forma correta, sendo uma técnica alternativa à utilização da imunofluorescência que pode apresentar artefatos decorrentes de substâncias fluorescentes e qualidade inferior na conservação morfológica dos tecidos (Haanwinckel, 2004).

INDICAÇÕES DA IMUNOHISTOQUÍMICA

Uma das principais indicações do exame imunohistoquímico é a tentativa de classificar histogenicamente neoplasias com aspectos indiferenciados nas lâminas de rotina, sejam elas de grandes ou pequenas células. Essa tentativa se faz necessária para que possa se aplicar esquemas de radio ou quimioterápicos mais adequados. Esse tipo de lesão caracteristicamente envolve diagnósticos diferenciais entre carcinoma, linfoma, sarcoma e melanoma (Barra,2006).

Isto se deve ao desenvolvimento da técnica de imunohistoquímica, através da qual podemos observar em um corte histológico convencional a presença das proteínas presentes naquele tecido. Sendo estas proteínas os fatores determinantes do comportamento biológico tecidual, seja ele tumoral ou não, podemos então estabelecer uma correlação entre a análise imunohistoquímica e as características da doença em questão (Pinho,2005).

Não existem dúvidas de que a imunohistoquímica é de grande valia no diagnóstico dos tumores do sistema nervoso central, ajudando a estabelecer novas entidades e reclassificando as neoplasias. Há uma contínua busca por estabelecer marcadores mais específicos, que poderão auxiliar no diagnóstico de certas linhagens celulares ainda não bem definidas (Barra,2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da técnica de imunohistoquímica para diagnóstico de neoplasias indiferenciadas na medicina veterinária está se tornando uma rotina laboratorial devido as reações cruzadas entre anticorpos humanos e animais. Essa técnica já vem sendo usada na medicina humana há alguns anos por se ter conhecimento do tipo de anticorpo específico para determinadas proteínas ou antígenos. É de fundamental importância para que consigam bons resultados com a imunohistoquímica, a escolha de anticorpos ideais, protocolos de reações adequados, além de se ter uma completa avaliação clínica associada a resultados de exames complementares. Nesta rotina diagnóstica, a imunohistoquímica pode ser utilizada em uma grande variedade de tecidos e situações, porém há interferências negativas nos resultados devido a não fixação e processamento adequado do material a ser analisado. Isto se deve a alta especificidade presente entre a interação dos anticorpos marcados com os antígenos pesquisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRA,M. B. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. Revista da AMRIGS, Porto Alegre, abr-jun. 2006.

HAANWINCKEL,M.C.S.,MEGID,J.,SOUZA,L.C. Avaliação da prova de imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, v.71,n.3,p.293-301, jul-set., 2004

PINHO,M.S.L. Imunohistoquímica: O Estudo da Biologia Molecular ao Alcance de Todos. **Rev bras Coloproct**, v. 25, n.2, abr-jun, 2005.

RUIZ,F.S., ALESSI,A.C.,CHAGAS,C.A., PINTO,G.A.,VASSALLO,J. Imunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *J. Bras. Patol. Med. lab*; jul-ago. 2005.

TOLOSA,E.M.C., RODRIGUES,C.J.,BEHMER,O.A., NETO,A.G.F. Manual de técnicas para histologia normal e patológica, ed. 2, p.197-199. 2003.