

# Imunohistoquímica

## Sumário

Definição.....	2
Glossário .....	2
Aplicação .....	2
Preparo do tecido .....	3
Fixação.....	3
Soluções fixadoras .....	3
Desidratação e clareamento. ....	3
Inclusão.....	3
Métodos Imunohistoquímicos.....	4
Recuperação Antigênica .....	5
Problemas em imunohistoquímica.....	5
Métodos de Bloqueio .....	6
Peroxidase endógena.....	6
Fosfatase alcalina endógena.....	6
Biotina endógena.....	6
Interações hidrofóbicas e iônicas .....	7
Controle de Qualidade .....	8
Dos reagentes .....	8
Controles de qualidade recomendados.....	8
Apêndice .....	9
Preparo das Lâminas .....	9
Preparo das Soluções .....	10
Protocolos.....	12
Imunoperoxidase indireta.....	12
Estreptoavidina – Biotina – Peroxidase .....	14

## Definição

O termo imunohistoquímica surgiu das palavras: imunologia, histologia e química. A imunologia estuda o sistema imunológico, a histologia estuda tecidos e órgãos utilizando-se o microscópio, após a sua coloração. Para facilitar a observação, diversos tipos de colorações podem ser usados para identificar diferentes partes de um tecido. O processo de identificar antígenos nos tecidos com anticorpos, através de secção corada é definido como imunohistoquímica.

## Glossário

**Antígeno:** qualquer substância que sob condições apropriadas é capaz de estimular a formação de anticorpos.

**Epitopo:** é o determinante antigênico, o sítio exato de ligação do anticorpo na molécula do antígeno.

**Biotina:** vitamina (vitamina H) de baixo peso molecular (244.3), hidrossolúvel, derivada da dieta e de bactérias intestinais. Pode ser ligada covalentemente a cadeias de aminoácidos ou açúcares de proteínas e glicoproteínas.

**Avidina:** é uma glicoproteína básica com PM de aproximadamente 68.000, obtida a partir da clara do ovo ocorrendo também no oviduto de várias espécies de pássaros. Molécula quadrivalente, tetrâmero com simetria 2:2, cada lado da molécula contendo um par de receptores para a biotina.

**Estreptoavidina:** obtida a partir do *Streptomyces avidinii* não contem carboidrato, possui ponto isoelétrico próximo ao neutro, mantém as propriedades de ligação da avidina sem apresentar, entretanto problemas físicos indesejáveis.

**Proteína A** proteína derivada da parede celular do *Staphylococcus aureus*, que se liga (ligação não imunológica) ao segmento Fc da IgG da maioria dos mamíferos (homem, coelho, camundongo, suíno e hamster).

**HIER :** Heat induced retrieval

**PIER :** Protein induced retrieval

## Aplicação

Os procedimentos de imunohistoquímica são aplicáveis a secções de parafina e criostato, esfregaços e suspensões celulares.

**Pré-requisito:** o antígeno tecidual deve permanecer insolúvel, a estrutura terciária do antígeno não deve estar alterada para que o sítio antigênico se ligue ao anticorpo.

## **Preparo do tecido**

**Colheita** da amostra, clivagem.

**Preservação** do tecido – Fixação ou congelamento em nitrogênio líquido.

### **Fixação**

Não há um fixador ideal. O fixador ideal deve preservar a morfologia, a imunorreatividade, prevenir a extração difusão e deslocamento do antígeno durante as etapas que se seguem à fixação e não interferir com as reações subseqüentes na localização do antígeno.

### **Soluções fixadoras**

<p style="text-align: center;"><b>Aldeídicas</b> pontes covalentes</p> <p><b>Formaldeído</b>      4-10% <b>Paraformaldeído</b>      4% <b>PLP</b>      periodato-lisina- paraformaldeído <b>Glutaraldeído</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Alcoólicas</b> coagulação de proteínas</p> <p><b>Carnoy</b> 70% etanol 20% clorofórmio 10% ac.acético glacial. <b>Metacarn</b> 70% metanol 20% clorofórmio 10% ac.acético glacial.</p>	<p style="text-align: center;"><b>Com adição de metais pesados</b></p> <p><b>Zinco</b> antígenos de membrana</p> <p><b>Merúrio – B5.</b> Ig intracelulares.</p>
---	--	---

### **Desidratação e clareamento.**

A desidratação parece ter pouco efeito na imunorreatividade da maioria dos antígenos. Quanto ao clareamento, os efeitos lesivos acarretados pelo uso do xilol podem ser revertidos com o emprego da tripsina.

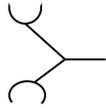
### **Inclusão.**

Não se deve ultrapassar a temperatura de 60°C quando da inclusão em parafina.

# Métodos Imunohistoquímicos



**Ag**



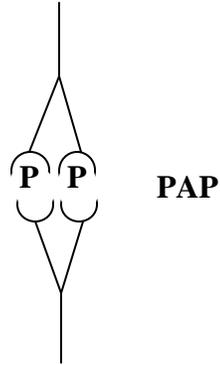
**Ac**



**Biotina**

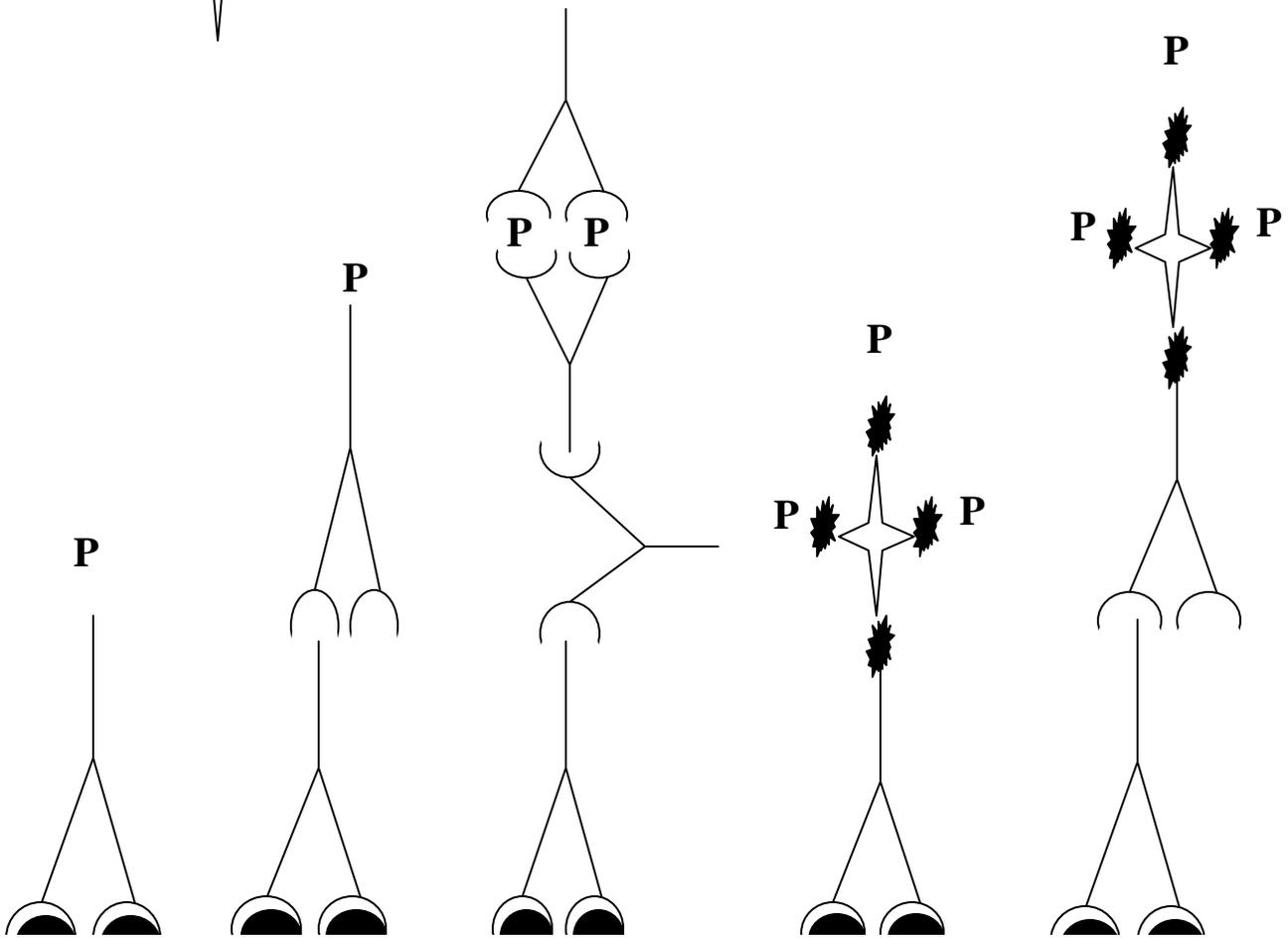


**Avidina**



**PAP**

**P Peroxidase**



Direto

Indireto

PAP

A-B-P

ABC

## **Recuperação Antigênica**

A fixação em formalina promove ligações múltiplas entre os grupos aminos e a formação de pontes de metileno entre os vários aminoácidos presentes nos peptídeos de uma determinada proteína e desta com as proteínas adjacentes. Estas múltiplas ligações bloqueiam o acesso de anticorpos aos epitopos alvo, mascarando o antígeno.

O desmascaramento se refere em geral aos métodos enzimático ou com utilização do calor aplicados com objetivo de melhorar a imunorreatividade dos tecidos.

A demonstração de que a digestão enzimática por protease melhorava a imunorreatividade dos tecidos por Huang em 1976 ganhou popularidade entre os Laboratórios ao permitir a utilização de um maior número de anticorpos que poderiam ser aplicados aos tecidos processados de maneira rotineira.

Como o número de anticorpos que se beneficiam com esta técnica é limitado quando comparado ao HIER e sendo técnica de difícil reprodutibilidade pelas características empíricas na determinação da concentração, tempo de digestão e tipo de protease é aconselhável otimizar o uso de uma ou no máximo duas proteases. No LPBC a digestão enzimática é feita com o uso de tripsina a 0,1% a 37°C, 30min.

O HIER primeiro relatado por Shi e cols., 1991 é feita em tampão citrato a 0,01M pH6.0 (Catorelli e cols.) em forno de microondas de 450Wats por 10 minutos mantendo uma temperatura constante de 90°C.

## **Problemas em imunohistoquímica**

A atividade de enzimas endógenas, a ligação inespecífica de anticorpos a componentes teciduais quer por ligações hidrofóbicas ou interações iônicas constituem as principais causas de coloração de fundo sem especificidade e indesejável em imunohistoquímica.

As principais causas de coloração de fundo são:

- Ligação ao receptor FC
- Presença de Biotina endógena
- Ligação a lectinas teciduais
- Reação cruzada inespecífica do Ac quando o epitopo do Ag a ser corado é partilhado com outras proteínas
- Difusão do Ag a ser investigado do local de síntese para o tecido circundante
- Presença do Ag em altas concentrações no plasma perfundindo o tecido anteriormente a sua fixação
- Ingestão do Ag por fagócitos, resultando em coloração não normalmente observada nestas células
- Injúria física do tecido causada por dessecação ou por incompleta fixação do tecido
- Autólise
- Resíduos do meio de embebição, desparafinização incompleta
- Contaminação pelo anticorpo secundário com anticorpos naturais que se ligam de forma inespecífica no tecido
- Reação cruzada do anticorpo secundário devido a reação cruzada entre espécies
- Hiperdigestão por enzimas proteolíticas
- Pigmentos teciduais coloridos similares ao produto final da reação

## **Métodos de Bloqueio**

### **Peroxidase endógena**

Normalmente ocorre atividade de peroxidase em hemácias, pseudoperoxidase, granulócitos, mieloperoxidase, hepatócitos, sistema nervoso central e tecidos sensíveis a estrogênio. As peroxidases endógenas, citocromo oxidase e catalase produzem produtos de reação com diaminobenzidina (DAB). Quando do uso de HRP “horseradish peroxidase” o bloqueio da peroxidase endógena deve ser procedimento de rotina.

Há vários métodos de bloqueio o mais comumente utilizado em cortes parafinados é 0,3 a 0,5% de peróxido de hidrogênio em metanol por 10 a 30 min à temperatura ambiente.

Como reagentes oxidativos podem danificar o sítio antigênico preconiza-se realizar o bloqueio da PE após a incubação com o Ac 1° na técnica de imunoperoxidase indireta e após o secundário quando se utiliza o Ac 2° biotinilado.

Um outro excelente bloqueador da PE é a azida sódica, utilizada a 0,1% em mistura com 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na solução tampão remove satisfatoriamente a atividade de mieloperoxidase de granulócitos e de pseudoperoxidase de hemácias. Também é o método de escolha para materiais criopreservados.

### **Fosfatase alcalina endógena**

A fosfatase alcalina (FA) está amplamente distribuída nos tecidos humanos. Isoenzimas de FA são encontradas em altas concentrações na mucosa intestinal, nos túbulos proximais do rim, em regiões calcificadas, na superfície de células endoteliais arteriais e de capilares, nas células reticulares do estroma, em neutrófilos, nos linfócitos da zona do manto em secções criopreservadas de linfonodos, baço e tonsilas.

O bloqueio efetivo é obtido com a adição de Levamisole 1-5mmol/l na solução substrato da enzima.

A fosfatase ácida não é afetada pelo Levamisole para prevenir esta atividade é essencial que o pH da solução substrato esteja em pH 8.0 ou acima.

### **Biotina endógena**

A biotina é vitamina e coenzima encontrada em diversos tecidos, particularmente no fígado, pulmão, baço, tecido adiposo, glândula mamária, rim e cérebro. A atividade da BE pode ser suprimida pelo uso de tampões alcalinos, a pré-incubação com avidina ou com leite desnatado. O método mais comumente utilizado é a técnica de supressão pela ligação biotina-avidina.

- PBS 2x 5 min
- Avidina 0,1% 10 min TA
- Escorrer e rinsar com PBS ou PBS 2x 5 min
- Biotina 0,01% 10 min TA
- PBS 2x 5 min

A pré-incubação com avidina permite o bloqueio da BE porque a biotina só é capaz de se ligar a uma única molécula de avidina.  
A aplicação subsequente de biotina é essencial para que se bloqueie receptores livres da avidina não ocupados pela BE.

## Interações hidrofóbicas e iônicas

Os conjugados de Peroxidase (HRP tipo IV) são proteínas básicas e podem se ligar de modo inespecífico a sítios aniônicos teciduais. A utilização de detergentes não iônicos (Triton X-100 a 0,5%) ou de proteínas inertes tais como soro fetal bovino, soro albumina bovina ao competir com os sítios de ligação reduz a absorção inespecífica.

As ligações inespecíficas devidas a Interações hidrofóbicas e iônicas são mais frequentemente observadas em tecido conjuntivo pela presença de colágeno elastina, laminina e proteoglicanos, epitélio e adipócitos.

As ligações hidrofóbicas entre proteínas teciduais e anticorpos são influenciadas pela fixação, fixadores aldeídicos, pelo Ac 1°, Ig são particularmente hidrofóbicas e pelo tipo e concentração iônica do tampão. O método mais eficiente de bloquear as interações hidrofóbicas é o uso de proteína bloqueadora em separado ou junto ao diluente do AC.

**Leite desnatado a 10% antes do Ac 1° 30 min 37° C**

### **Diluentes para o AC primário e Secundário**

**Ac monoclonal – BSA a 2%**

**Ac policlonal - Soro normal da espécie do tecido a 10%**

Caso persista coloração de fundo mesmo após teste de controle de titulação, intercalar após o AC 1° incubação por 30 min a TA de soro normal da mesma espécie do AC 2°.

## **Controle de Qualidade**

### **Dos reagentes**

**Do método:** controles positivos e negativos.

#### Controles Negativos

- Substituição do Ac 1° por isotipo da mesma espécie
- Absorção do Ac 1° com o Ag

### **Controles de qualidade recomendados**

- Omissão do Ac 1°
- Substituição do 1° Ac por soro não imune
- Substituição do 1° Ac por outro Ac dirigido por um Ag diverso ao em estudo
- Absorção do 1° Ac com o Ag utilizado em sua geração
- Inclusão no painel de vimetina – controle do dano tecidual.

## Apêndice

### Preparo das Lâminas

#### Lavagem das lâminas

- Mergulhar as lâminas em solução de detergente neutro Extran a 0,5% em água por 30 min.
- Desprezar o detergente e lavar em água corrente até completa remoção do detergente (no mínimo por 2 h)
- Lavar as lâminas em água destilada várias vezes
- Colocar as lâminas em solução de HCl 2N por 5 min.
- Lavar em água destilada por 1 min
- Lavar em solução de HCL 1% em etanol 70% por 5 min
- Lavar em água destilada
- Secar em estufa a 70°
- Guardar as lâminas limpas em caixas para evitar contaminação por poeira.

#### Poly-L-Lysina

- Colocar as lâminas em solução de poly-L-lysina (1:10), utilizar recipientes plásticos
- Secar em estufa a 60° por uma hora ou overnight a TA
- Guardar as lâminas limpas em caixas para evitar contaminação por poeira.

100 ml de Poly-L-lysina / 90 lâminas

- Estocar a solução diluída em água deionizada a 2-8° e desprezar caso fique turva.

#### Silanização de lâminas

O APTS (silano) pode causar queimaduras na pele, portanto, o mesmo deverá ser manipulado com luvas e com cuidado.

Preparar 3 cubas de vidro com tampa, na capela:

1. acetona PA
2. solução APTS (Sigma A3648) a 4% em acetona
3. acetona PA

**Silanização:**

- Imersão das lâminas em acetona (cuba 1) por 2 min, esgotar muito bem o excesso de acetona para não diluir a solução de APTS
- Imersão em APTS a 4% (cuba 2) por 2 minutos, esgotar bem o excesso
- Imersão em acetona (cuba3) por 4 vezes, esgotar bem o excesso
- Secagem em estufa, deixar esfriar e guardá-las em caixas.

O conteúdo das cubas 1 e 3 podem ser descartados na pia com água corrente, o conteúdo da cuba 2 não deverá ser descartado na pia, conservar em recipiente devidamente identificado para posterior descarte.

**Preparo das Soluções****Tampão PBS**

Para 1 litro de solução

1,38g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$

6,96g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

7,2g de  $\text{NaCl}$

Diluí-los em 1litro de água destilada, checar o pH e guardar em geladeira.

**Tampão TBS**

**Solução estoque:** 6,06g de Tris HCl

1,39g de Tris base

100ml de água destilada

**Solução estoque:** Solução salina de 0,15M:

0,89g de  $\text{NaCl}$

100ml de água destilada

**Solução para uso:** TBS: 1/10: Diluir 1 parte de TrisHCl pH7.6 em 9 partes de solução salina 0,15M.

**Tampão citrato pH 6.0**

2,1g de ácido cítrico

1000ml de água destilada, acertar o pH com  $\text{NaOH}$  2 M, serão adicionados aproximadamente 13ml de base.

**PBS + 2% BSA**

PBS 10ml

BSA 200mg (Bovine serum albumin)

**Leite desnatado a 10%**

H<sub>2</sub>O d. 100ml  
 Leite 10g

**PBS + 1% SFB**

PBS 100ml  
 SFB 1ml

**Tripsina**

Cloreto de cálcio 100mg  
 Tripsina 100mg (Sigma cat n. T78128)  
 Cloreto de sódio 900mg  
 H<sub>2</sub>O d 100ml

Tripsina 100mg (Gibco 1:250, cat n. 27250-018)  
 PBS 100mg

**Hematoxilina de Gill**

Para 100ml de solução

Hematoxilina	200mg
Iodato de sódio	20mg
Sulfato de alumínio.18 H <sub>2</sub> O	1,76mg
Ácido acético glacial	2ml
Etileno glicol	25ml
Azida sódica	250ul
H <sub>2</sub> O destilada	Completar para 100ml

Tempo de coloração – 3 minutos.

**DAB (solução estoque)**

DAB 25mg (Sigma D5637)  
 H<sub>2</sub>O d. 10ml

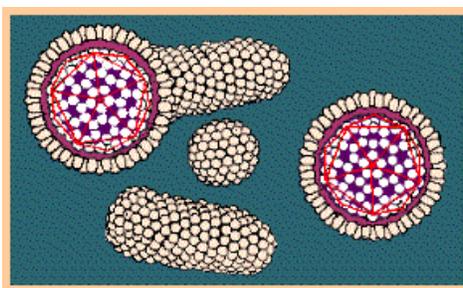
## Protocolos

### Imunoperoxidase indireta

#### Identificação do antígeno HBS – Teste de titulação do Ac Primário

**Material de estudo:** secções de fígado humano fixados em Bouin.

*Segundo Objetivo:* verificar a importância da titulação do Ac primário.



#### Desparafinização

Xilol 3x 10 min cada

Acetona pa 5 min

#### Hidratação

Álcool absoluto 2x de 5 min cada

Álcool 70% 3 min

Álcool 50% 3 min

Álcool 30% 3 min

Lavar em água corrente e destilada rapidamente

Lavar em PBS 2x 5min

#### Bloqueio de ligações inespecíficas

Leite desnatado a 10% em água destilada – 15 min a TA

#### Anticorpo primário - IgG de cabra anti-HBSAg (Dako)

1:1000 + soro AB 5% + SFB 1% em PBS - 1h a TA

1:500 + soro AB5% em PBS - 1h a TA

#### Bloqueio da Peroxidase endógena

Metanol + 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 10 min TA

Lavar em água destilada 3x

Lavar em PBS 2x 5min

### Anticorpo secundário – anti-IgG de cabra Peroxidase

1:200 + soro AB 10% em PBS - 45 min 37°C

Lavar em PBS 2x 5min

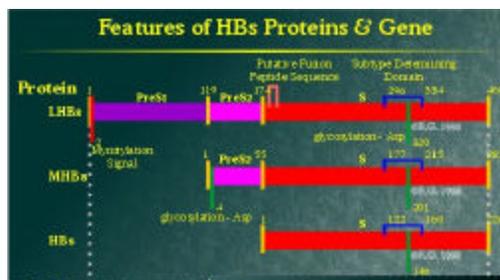
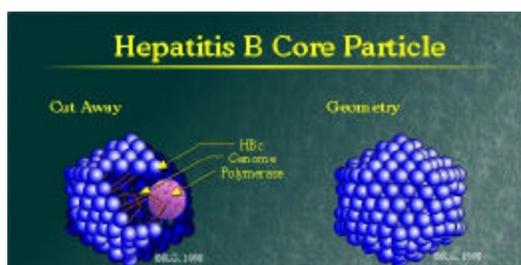
### DAB

Preparar em frasco escuro. Filtrar na hora de uso

Tampão 1000ml

DAB (sol estoque) 24 ul

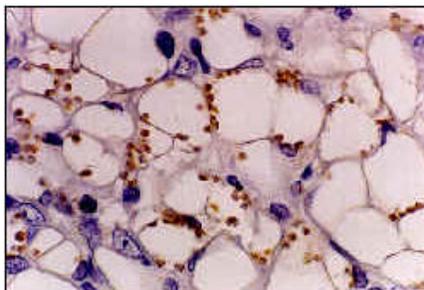
H2O2 1ul



## Estreptoavidina – Biotina – Peroxidase

**Material de estudo:** Secções de pata de camundongo infectadas com *Leishmania amazonensis*.

*Segundo Objetivo:* verificar a importância do bloqueio da peroxidase endógena.



### Desparafinização

Xilol 3x 10 min cada

Acetona pa 5 min

### Hidratação

Álcool absoluto 2x de 5 min cada

Álcool 70% 3 min

Álcool 50% 3 min

Álcool 30% 3 min

Lavar em água corrente e destilada rapidamente

Lavar em PBS 2x 5min

### Bloqueio de ligações inespecíficas

Leite desnatado a 10% em água destilada – 15 min a TA

### Anticorpo primário - IgG de coelho anti-L.a (LINC)

1:1000 + soro camundongo normal a 10% em PBS – overnight a 4 °C

Estabilizar a TA 30min

Lavar em PBS 2x 5min

### Anticorpo secundário – anti-IgG de coelho Biotinilada

1: 1.600 + soro camundongo normal a 10% em PBS - 45 min 37°C

Lavar em PBS 2x 5min

### Bloqueio da Peroxidase endógena. (NÃO FAZER EM UMA DAS LÂMINAS)

Metanol + 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.1% Azida sódica - 10 min TA

Lavar em água destilada 3x  
Lavar em PBS 2x 5min

### **Estreptoavidina Peroxidase**

1: 2000 em PBS

Lavar em PBS 2x 5min

### **DAB**

Solução estoque: 25mg de DAB/10ml de água destilada.

Preparar em frasco escuro. Filtrar na hora de uso.

### **Solução de uso**

Tampão	1000ml
DAB (sol estoque)	24 ul
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1ul

Lavar em água corrente 5 min e destilada 3x

### **Contracoloração e Montagem**

Hematoxilina de Gill – 3 min. Filtrar na hora de uso.

Lavar em água corrente 5 min e destilada 3 min.

### **Desidratação**

Álcool absoluto 2x 5 min

### **Clareamento**

Xilol 2x o último deixar por 5 min

Montar em bálsamo do Canadá diluído em xilol.

