

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES TUMORAIS EM INTESTINOS NEOPLÁSICOS

Henrique Pereira dos Santos (PIBIC/FA/Uem), Daniel Augusto Nunes de Lima, Raíssa Bocchi Pedroso, Priscilla de Laet Sant'Ana, Edilson Noboioshi Kaneshima, Alice Maria de Souza-Kaneshima, Tânia Cristina Alexandrino Becker (Orientador), e-mail: tcabecker@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Ciências da Saúde/ Medicina Preventiva

Palavras-Chave: Câncer colorretal, Imuno-histoquímica, Ki-67.

Resumo

A técnica de imuno-histoquímica pode ser usada na pesquisa de variadas biomoléculas que podem ser antígenos em células em multiplicação, em diferentes situações dentro de laboratórios de pesquisa. O objetivo deste estudo foi padronizar a técnica de imuno-histoquímica para detecção da proteína Ki-67. Foram selecionados blocos parafinizados de órgãos proveniente de ratos saudáveis para padronização da técnica. Realizamos a padronização em 03 etapas (experimento 01, 02 e 03), onde avaliamos dois kits, o SuperPicTure™ Polymer Detection Kit (Kit 1) e o Histostain®-Plus Kit (Kit 2). Nossos resultados demonstraram que a técnica da IH revela que o uso do Ki-67 em conjunto com outros marcadores pode ser detectado por esta técnica, contribuindo diretamente no estabelecimento do diagnóstico de neoplasias. Porém, se faz necessário mais testes, com outros biomarcadores bem como com o *SuperPicTure™ Polymer Detection Kit*, para melhor padronização da técnica em nosso laboratório e obtermos mais informações que contribuam na caracterização de neoplasias em relação ao seu comportamento biológico.

Introdução

A técnica de imuno-histoquímica (IH) é usada na pesquisa de biomoléculas, de populações celulares específicas, podendo ser usadas em laboratórios de pesquisa e anatomia patológica, como no diagnóstico histogenético de neoplasias morfológicamente não-diferenciadas, na caracterização de neoplasias malignas, na pesquisa de fatores prognósticos e indicações terapêuticas de algumas doenças, dentre outras (Mattos *et al*, 2010). As criptas aberrantes (CA) e os focos de criptas aberrantes (FCA) são considerados lesões pré-neoplásicas e marcadores de câncer de cólon. Elas apresentam alterações morfológicas (tamanho maior, borda alargada e forma elíptica em relação as criptas normais) e celulares (hiperplasia e

displasia) (Cheng e Lai, 2003). Alterações bioquímicas e imuno-histoquímicas têm sido detectadas nos FCAs, como alteração da expressão de β -catenina, P-caderina, hexosaminidase, COX-2 dentre outros biomarcadores (Mattos et al, 2010). Desta maneira, o objetivo deste projeto foi padronizar a técnica de IHQ no laboratório de patologia geral da UEM, que atualmente desenvolve trabalhos envolvidos com a indução do câncer colorretal em ratos Wistar.

Materiais E Métodos

Animais: usamos blocos parafinizados dos órgãos: fígado, intestino delgado e colón proveniente de ratos saudáveis, sem indução de neoplasias, disponíveis no laboratório de patologia geral – UEM, devido atraso na aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Processamento histológico: Os blocos parafinizados foram seccionados em micrótomo semi-automático e aderidos em lâminas com silazina. Estas foram desparafinadas em xilol, alcoolizadas e hidratadas com água destilada.

Método Imuno-histoquímico: a padronização foi em 03 etapas, denominadas experimento 01, 02 e 03. Avaliamos 02 kits para detecção IHQ, o *SuperPicTure™ Polymer Detection Kit* (Kit 1), e o *Histostain®-Plus Kit* (Kit 2) (Invitrogen).

Para ambos os kits, o processamento das amostras foram os mesmos: **Recuperação Antigênica:** incubamos com tampão citrato *Antigen Retrieval Solution – Low pH 10X* (Invitrogen). As lâminas foram lavadas com água destilada e secas, as bordas dos cortes foram delimitadas com caneta hidrofóbica.

Bloqueio da peroxidase endógena: esta foi bloqueada com solução metanólica de peróxido de hidrogênio a 3% e lavadas com PBS.

Bloqueio das Ligações Inespecíficas: os cortes foram tratados Soro de Burro e BSA (albumina bovina). **Anticorpo Primário:** utilizamos 50µL por corte: Anti-Ki67 [SP6] (Abcam), nas diluições 1:100, 1:250, 1:500 e 1:1000; anti-PCNA (1:500) (Abcam) e anti-5HT (1:100 e 1:600).

Deteção de anticorpo primário: As lâminas foram lavadas com PBS e tratadas segundo o protocolo dos kits de detecção: Kit 1 – 20 µL do kit de detecção, em cada corte, seguido de lavagem com PBS-T. Kit 2 – 30 µL do reagente de detecção, em cada corte, seguido de lavagem com PBS.

Revelação e coloração: Utilizamos o reagente *Stable Diamino benzidine* (DAB) sobre os cortes e contra coramos com Hematoxilina de Meyer. As lâminas foram desidratadas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol, e montadas com resina e lamínula.

Resultados E Discussão

Experimento 01: Utilizamos o AC anti Ki-67 no tecido hepático, conforme “*Datasheet*” e o Kit 1 de detecção. A titulação do AC seguiu com as diluições: 1:100; 1:250; 1:500 e 1:1000 (em duplicata) e controles negativos (sem o AC 1º). O experimento 1 não apresentou resultados conclusivos, onde no fígado não houve marcações em nenhuma diluição utilizada e sem diferenças entre os cortes marcados e os controles (figura 01- A). A Ki-67 é

uma proteína nuclear, presente nas fases ativas do ciclo celular, tendo relação direta com a fração de crescimento da população celular (BARRA, 2006). Desta maneira, como o tecido hepático tem baixa taxa de regeneração celular, possivelmente a escolha deste tecido foi inadequada para a titulação pretendida. Para tanto, procedemos aos demais experimentos com novos cortes de tecido.

Experimento 2: Utilizamos o AC anti Ki-67 no tecido hepático, nas mesmas diluições testadas no experimento 1 e, o Kit 1 de detecção. Para confirmar se os resultados obtidos no experimento anterior eram válidos, avaliamos também o AC anti Ki-67 em intestino delgado e o AC anti-5-HT (serotonina) em tecido hepático (figura 01-B,C). Neste experimento, novamente o AC anti-Ki67 não foi detectado no fígado, diferente do AC anti-5-HT que apresentou marcação castanho brilhante. Assim, confirmamos que o tecido hepático não é um bom controle positivo para detecção de proliferação celular (diferente do que sugere o “datasheet” do fabricante) para este AC. No corte de intestino delgado o AC anti ki-67 foi detectado, indicando ser este tecido um bom controle positivo.

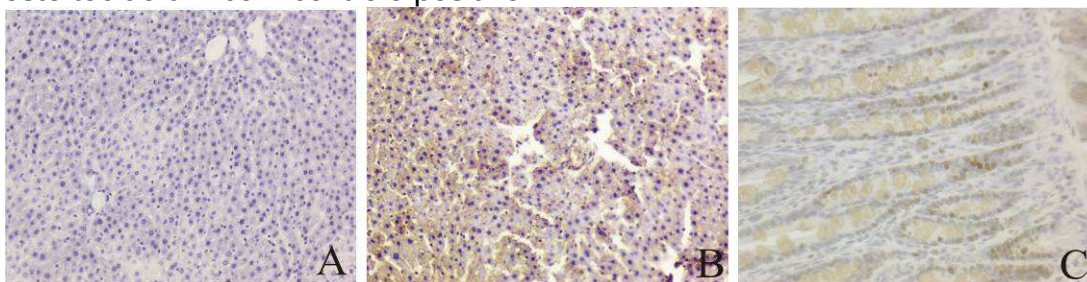


Figura 1. Micrografias de IHQ com o kit 01 e o AC anti-ki-67 (1:250) em fígado de rato (400X) (A), IHQ com AC anti 5-HT (1:600) em fígado de rato (400X) (B) e IHQ com AC anti-ki-67 (1:250) em intestino delgado de rato (400X) (C).

Experimento 3: Utilizamos o AC anti Ki-67 (1:250) para avaliarmos o kit de detecção SuperPicTure™ Polymer Detection Kit (Kit 1). Para comparação, usamos o kit de detecção Histostain®-Plus Kit (Kit 2). Observou-se que o kit 2 (Histostain®-Plus Kit) apresentou melhor detecção tanto para o AC anti-PCNA quanto para o AC anti-Ki67. Quando avaliamos o kit 1, para o AC anti-PCNA, não obtivemos uma boa marcação. Para o AC anti ki-67, observamos marcação discreta nas células (figura 02). Baseados nestes resultados, várias dúvidas surgiram quanto a qualidade e escolha do *SuperPicTure™ Polymer Detection Kit*. O kit 2 (Histostain®-Plus Kit) com o qual obtivemos melhores resultados não é mais comercializado, e o detector substituído do primeiro, o kit 1, não apresentou resultados relevantes. Entramos em contato com o fornecedor dos kits, e a empresa nos fornecerá uma nova amostra de lote diferente do kit 1, para novas avaliações. No estudo de adenomas de pacientes todos expressaram a proteína Ki-67 pela IHQ, visto que ela é expressa em todos os tecidos em estágios de divisão celular, porém, nos adenomas displásicos a expressão foi significativamente maior (SOUSA, W.A.T). Esses dados da literatura se assemelham com os resultados aqui apresentados, onde a imunodetecção da proteína Ki-67 mostraram ser um método eficaz para observar as células em proliferação. Este dado indica

que a utilização da expressão de Ki-67 pode ser usada como uma possível ferramenta prognóstica para o câncer colorretal.

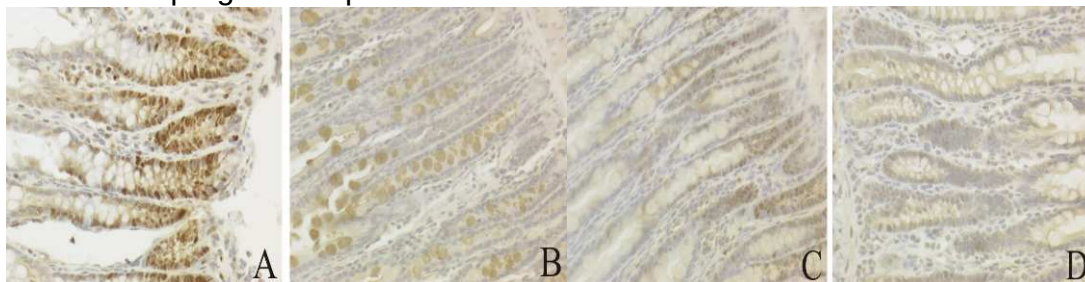


Figura 2. Micrografias de IHQ com o kit 02 (A e C) e kit 01 (B e D), em intestino delgado de rato com o AC anti-ki-67 (1:250) (C e D) e AC anti PCNA (1:500) (A e B) (400x).

Conclusões

Nossos resultados demonstram que a padronização da técnica de IHQ para detecção de biomarcadores será muito importante para os estudos avaliativos das neoplasias em nosso laboratório. Porém, em razão das dificuldades encontradas durante a realização dos experimentos descritos, faz-se necessário mais análises testes, com outros biomarcadores bem como com o *SuperPicTure™ Polymer Detection Kit*.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pelos recursos financeiros enviados para o pagamento de bolsa de Iniciação Científica concedida ao discente deste projeto de pesquisa.

Referências

BARRA, M.B. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Rev. AMRIGS**, Porto Alegre, v.50, n.2, p. 173-184, 2006.

CHENG, L.; LAI, MD. Aberrant Crypt Foci as Microscopic Precursors of Colorectal Câncer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 12, p. 2642-2649. 2003.

MATOS, L.L. *et al.* Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. **Biomarkers Insights**, v. 5, p. 9-20. 2010.

Souza, W.A.T. **Análise Imunohistoquímica da expressão das proteínas P53 e Ki-67 em adenomas colorretais**. 2010. 150f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.