



investigação

Amplificação em imunocitoquímica: estudo comparativo de sistemas de polímeros

Amadeu Borges Ferro¹; Ana Margarida Rodrigues¹
 1 - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

Correspondência para Amadeu Ferro - e-mail: amadeu.ferro@estesl.ipl.pt

RESUMO

Desde o início da utilização da imunocitoquímica em anatomia patológica, um dos objectivos tem sido detectar as quantidades mais ínfimas de antigénio, tornando-o visível ao microscópio óptico. Vários sistemas de amplificação têm sido aplicados de forma a concretizar este objectivo, tendo surgido um grupo genérico de métodos simples e que apresentam uma amplificação superior: são os denominados métodos do polímero indirecto. Tendo em conta a variedade de métodos disponíveis, os autores propõem-se a comparar a sensibilidade de quatro sistemas de amplificação, que recorrem ao método do polímero indirecto com horseradish peroxidase (HRP). Foram utilizadas lâminas de diferentes tecidos, fixados em formol e incluídos em parafina, nos quais se procedeu à identificação de 15 antigénios distintos. Na amplificação recorreu-se a quatro sistemas de polímero indirecto (Dako EnVision+ System K4006; LabVision UltraVision LP Detection System TL-004-HD; Novocastra NovoLink RE7140-k; Vector ImmPRESS Reagent Kit MP-7402). A observação microscópica e classificação da marcação obtida foi feita com base num algoritmo que enquadra intensidade, marcação específica, contraste e fundo, num score global que pode tomar valores entre 0 e 25. Para o tratamento estatístico foi utilizado o teste one-way ANOVA com post-hoc de tukey (alfa=0.05). O melhor resultado obtido em termos de par média/desvio-padrão dos scores globais foi o do NovoLink (22.4/2.37) e o pior EnVision+ (17.43/3.86). Verificou-se ainda que existe diferença estatística entre os resultados obtidos pelo sistema NovoLink e os sistemas UltraVision (p=.004), ImmPRESS (p=.000) e EnVision+ (p=.000). Concluiu-se que o sistema que permitiu a obtenção de melhores resultados, neste estudo, foi o NovoLink.

PALAVRAS-CHAVE: Imunocitoquímica, amplificação, polímero.

INTRODUÇÃO

Desde o início da utilização dos métodos imunocitoquímicos em anatomia patológica que um dos objectivos dos investigadores envolvidos nesta área tem sido detectar, nas células e tecidos em estudo, até as quantidades mais ínfimas de antigénio [1]. Vários Sistemas de Amplificação (SA) têm sido aplicados de forma a concretizar este objectivo - método indirecto simples, método PAP, métodos da avidina-biotina. Surgiu posteriormente um método, de articulado simples e que propõe uma amplificação superior. É o denominado método do polímero indirecto [2].

A utilização dos polímeros na área da imunocitoquímica trouxe como mais-valias, o grande poder de amplificação, a diminuição de factores de erro, a rapidez e a simplicidade, quando comparado com os outros métodos imunocitoquímicos [3, 4]. A grande desvantagem é o facto de ser um método um pouco mais dispendioso, o que, apesar de tudo, é um factor "menor" tendo em conta as qualidades que

apresenta [5].

Considerando a vasta gama de SA baseados em polímeros que hoje em dia vão surgindo, há um interesse em seleccionar o mais amplificativo e versátil, por parte de quem empenhadamente quer trabalhar com produtos fiáveis, no sentido de otimizar as técnicas realizadas [6].

Objectivos e Variáveis

Como objectivo geral deste trabalho pretendeu-se analisar as capacidades de amplificação de quatro SA actualmente disponíveis no mercado. Sucintamente delinearão-se os seguintes objectivos específicos:

1. Comparar os resultados imunocitoquímicos obtidos pelos SA:
 - a. EnVision+ System HRP Mouse (DAB+).
 - b. ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit;
 - c. UltraVision LP;
 - d. NovoLink Polymer Detection System.
2. Identificar o sistema de amplificação mais

adequado para a utilização de rotina no laboratório de anatomia patológica. Considerou-se, como variável independente, o SA utilizado, e, como variável dependente, a qualidade final da marcação imunocitoquímica.

Os Sistemas de Amplificação em Estudo

O SA EnVision+ da Dako apresenta um polímero constituído por uma grande molécula de dextrano, não contendo avidina ou biotina, pelo que a marcação inespecífica resultante de actividade endógena da biotina em tecidos como o fígado, rim ou tecidos linfóides, não ocorre. Este polímero permite a detecção de antígenos presentes em pequenas concentrações, contudo é aconselhada a utilização de controlos para uma melhor interpretação. Todos os reagentes do SA estão prontos a usar, excepto o 3'3 DAB [7]. Numa experiência desenvolvida em Itália, Sabattini e colegas compararam diferentes técnicas imunocitoquímicas, como o EnVision+, APAAP, ChemMate, CSA, LABC e SABC, chegando à conclusão de que o EnVision+ é um sistema fácil de usar, reduzindo o custo por teste e aumentando as diluições dos anticorpos primários [2]. Sendo um procedimento de dois passos, reduz o tempo do ensaio e simplifica a técnica. Na realidade, é referido que com o EnVision+ se conseguiam diluições de duas a cinco vezes superiores às utilizadas noutras técnicas, mantendo-se o mesmo nível de intensidade de marcação e de percentagem de células marcadas [2]. Em anticorpos mais difíceis de amplificar, o EnVision+ revelou ser a melhor técnica, conseguindo-se resultados consistentes e reprodutíveis em amostras excessivamente fixadas. Apenas o método CSA permitiu as mesmas diluições que o EnVision+ [2].

Wiedorn e colegas vieram provar que o sistema EnVision+ quando aplicado após a hibridização *in situ* resulta num aumento considerável de intensidade e sensibilidade, sem perda de especificidade quando comparada com os resultados convencionais [5]. Somente quando comparado com o sistema de detecção GenPoint, baseado em tiramida biotinilada, o EnVision+ revela uma menor sensibilidade. Apesar disso, os mesmos autores, afirmam que o EnVision+ é mais fácil de aplicar, requer menor tempo para a realização da técnica e não apresenta os problemas de marcação de fundo que podem ser encontrados com o GenPoint [5].

O ImmPRESS da Vector Laboratories é baseado num novo método, em que se usam micro-polímeros de enzimas, evitando o uso de grandes moléculas de dextrano que actuam como esqueleto interno. A ligação do micro-polímero

ao anticorpo permite que uma maior quantidade de enzimas se liguem ao alvo com um mínimo de interferência, daqui resultando uma redução dos passos do protocolo, uma maior intensidade de marcação específica e menor fundo [8].

O UltraVision LP da LabVision também pertence à segunda geração de polímeros, sendo composto por subunidades mais pequenas de polímeros, o que minimiza conflitos de marcação inespecífica, tendo como resultado uma marcação mais consistente e uma melhor amplificação do sinal. Isto favorece e aumenta a sensibilidade e eficiência do anticorpo. De acordo com as indicações do fabricante, com o UltraVision LP consome-se menos anticorpo primário e obtém-se melhor relação entre marcação específica e fundo. Também não utiliza biotina, o que impede o fundo característico dos métodos de LSAB [9].

O NovoLink da Novocastra à semelhança de outros SA referidos, também utiliza uma nova tecnologia de controlo da polimerização para a preparação de conjugados de anticorpo-HRP, evitando a marcação inespecífica devida à biotina endógena, evidente com a utilização das técnicas que recorrem a essa proteína [10].

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se tecidos humanos (pulmão, fígado e apêndice íleo-cecal, entre outros) que se sabia serem positivos para cada um dos anticorpos utilizados. Os tecidos tinham sido previamente fixados em formol tamponado a 10% e, após processamento histológico, incluídos em blocos de parafina. Com base nestes diferentes blocos, obteve-se um total de 120 cortes histológicos de 3µm, que foram utilizados para efectuar as marcações imunocitoquímicas com os quatro SA em estudo (30 lâminas para cada SA).

Foram utilizados 15 soros primários, incluindo anti-CD8, anti-receptores de progesterona e anti-desmina, entre outros (Tabela 1). Estes soros foram seleccionados de forma a constituir um painel diversificado que permitisse a marcação de vários alvos com localizações celulares diferentes (membrana, citoplasma ou núcleo).

Foi utilizada, para cada um dos soros, uma diluição de trabalho que implicou a duplicação das diluições em uso no laboratório de imunocitoquímica da ESTeSL, de forma a criar-se uma situação de exigência que revelasse as verdadeiras capacidades amplificativas dos SA utilizados. Como exemplo deste procedimento temos o soro anti-desmina cuja diluição de trabalho aferida para aplicação de rotina era de

1/100 e que neste estudo foi utilizado a 1/200 (2x100).

SORO	CLONE	MARCA	DILUIÇÃO PRÉVIA DO LABORATÓRIO	DILUIÇÃO UTILIZADA NESTE ESTUDO
1	Anti Cadeias leves Kappa	Kp53	Novocastra™	1:1000
2	Anti Cadeias leves Lambda	HP6054	Novocastra™	1:100
3	Anti Caldesmon	h CD	DakoCytomation	1:500
4	Anti CD 105	SN6h	DakoCytomation	1:10
5	Anti CD 45 RA	MB1	Novocastra™	1:80
6	Anti CD 79a	11D10	Novocastra™	1:100
7	Anti CD 8	4B11	Novocastra™	1:40
8	Anti CEA	12-140-10	Novocastra™	1:200
9	Anti CK 7	OV-TL 12/30	Novocastra™	1:50
10	Anti CK 8/18	5D3	Novocastra™	1:100
11	Anti Desmina	DER11	Novocastra™	1:100
12	Anti Ki 67	MM1	Novocastra™	1:100
13	Anti Receptores de Progesterona	1A6	Novocastra™	1:200
14	Anti Vimentina	V9	Novocastra™	1:100
15	Anti αFP	C3	Novocastra™	1:50

Tabela 1 - Características dos Soros utilizados.

As referências dos SA utilizados foram:

- EnVision+ System, HRP; DakoCytomation. Ref:K4007;
- ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit; Vector Laboratories, Inc. Ref: MP-7402;
- UltraVision LP; LABVision. Ref: TL-015-HD;
- NovoLink Polymer Detection System (250 test); Novocastra™. Ref: RE7140-CE.

Para permitir uma verdadeira comparação de SA, optou-se por utilizar a totalidade de reagentes fornecidos nas embalagens comerciais dos SA, mesmo sabendo que estas não incluem todas os mesmos reagentes (Tabela 2).

Seguindo as indicações dos fabricantes (Tabela 3), o protocolo genérico utilizado foi:

1. Desparafinar em Xilol - 10 min.
2. Recuperação Antigénica com solução de EDTA 1mM (pH 8.0) em microondas a 700w - 15 min.
3. Bloqueio da Peroxidase Endógena com o reagente de bloqueio de cada um dos SA -5 min.
4. Bloqueio Proteico de acordo com os reagentes presentes no ImmPRESS, NovoLink e UltraVision. Não foi efectuado este passo no Envision+, uma vez que não é recomendado pelo fabricante.

5. Soro Primário, utilizando as diluições de trabalho já referidas - 30 min.

6. Activador. Os Sistemas NovoLink e UltraVision, incluem uma solução com esta denominação que é aplicada durante 30 min e 20 min, respectivamente.

7. Polímeros - 30 min.

8. Cromogénio. 3'3-DAB de cada um dos Sistemas - 5 min.

9. Contraste. Utilizou-se Hematoxilina de Mayer para todos os testes, excepto para o NovoLink, que possui a sua própria Hematoxilina.

Decidiu-se quantificar a qualidade da marcação imunocitoquímica 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;
- Marcação específica;
- Contraste;
- Fundo.

Posteriormente foi aplicado, às classificações obtidas, o algoritmo:

$$(3 \times \text{intensidade}) + (2 \times \text{marcação específica}) + \text{contraste} + \text{fundo} = \text{Score Global.}$$

EnVision+	ImmPRESS	UltraVision	NovoLink
Bloqueio Peroxidase Endógena			
	Bloqueio Proteico	Bloqueio Proteico	Bloqueio Proteico
		Activador	Activador
Polímero	Polímero	Polímero	Polímero
DAB			DAB
			Hematoxilina

Tabela 2 - Reagentes disponibilizados por cada sistema.

EnVision+	ImmPRESS	UltraVision	NovoLink
Desparafinar			
Recuperação Antigénica (EDTA pH 8.0)			
Bloqueio Peroxidase Endógena			
	Bloqueio Proteico		
Soro Primário		Activador	
Polímero			
DAB			
Hematoxilina			

Tabela 3 - Protocolo utilizado.

Desta forma procura-se garantir que ao maior score equivale a melhor qualidade de marcação imunocitoquímica. O Score Global (SG) pode tomar valores entre 0 (pior resultado possível, em que não há intensidade de marcação imunocitoquímica, não há marcação específica, não há contraste, havendo somente forte marcação de fundo) e 25 (melhor resultado possível, implicando uma lâmina com todas as células marcadas especificamente com muita intensidade, um contraste também muito intenso e sem marcação de fundo).

O SG de cada caso foi analisado estatisticamente recorrendo a métodos multivariados como o one-way ANOVA com *post-hoc* de Tukey para $\alpha=0,050$.

RESULTADOS

Para o parâmetro *intensidade* o SA NovoLink obteve uma classificação média de 3,42, seguido do UltraVision (2,90), depois o ImmPRESS (2,35) e, finalmente, o EnVision+ (2,12). Relativamente à *marcação específica*, volta a constatar-se a mesma hierarquia, surgindo em pior posição o EnVision+ com uma média de 2,28. O ImmPRESS apresenta 2,45, o UltraVision 2,70 e o NovoLink tem média de 2,87. Repete-se esta tendência no item *contraste* sendo as médias mais baixas as do UltraVision (3,57), EnVision+ (3,63) e ImmPRESS (3,67), e a mais alta é do NovoLink (3,68). Quanto à parcela que avalia o *fundo* verificou-se que a média mais baixa, logo a que identifica mais fundo, é a do UltraVision (2,77), seguido do ImmPRESS (2,85), o NovoLink (2,87) e o EnVision (2,88).

O SG médio mais elevado (22,40) foi conquistado pelo NovoLink e o SG médio mais reduzido foi o do EnVision+ (17,43). O sistema UltraVision obteve um resultado final de 20,43 e o ImmPRESS 18,47 - Figura 1.

Relativamente à dispersão de resultados verifica-se que o sistema NovoLink é o que apresenta menor amplitude de resultados enquanto o ImmPRESS é o que apresenta maior

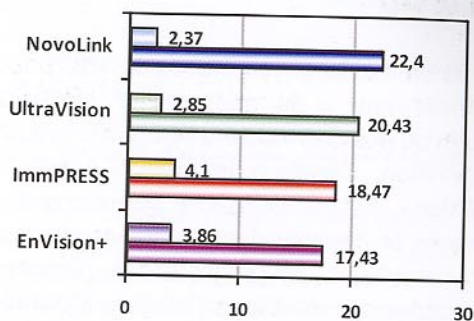


Figura 1 - Média e desvio-padrão.

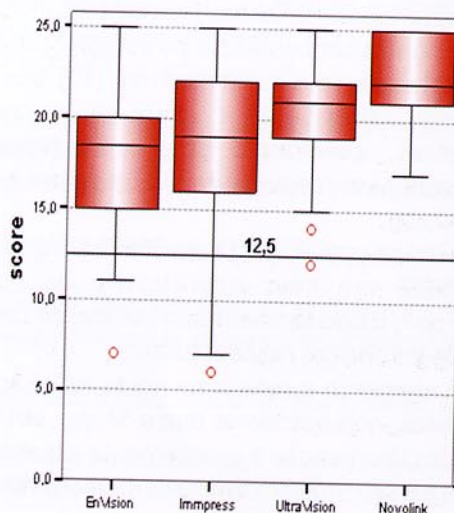


Figura 2 - Dispersão dos Resultados.

A aplicação do teste one-way ANOVA indicou a presença de diferenças relevantes entre os SA ($p=,000$). Os valores obtidos com a aplicação do teste *post-hoc* de Tukey (Tabela 4) permitem constatar que as técnicas apresentam as seguintes relações:

- O sistema EnVision+ obteve resultados estatisticamente equivalentes ao sistema ImmPRESS e inferiores aos UltraVision ($p=,000$) e NovoLink ($p=,000$).
- O sistema ImmPRESS obteve resultados estatisticamente inferiores aos UltraVision ($p=,009$) e NovoLink ($p=,000$).
- O sistema UltraVision obteve resultados estatisticamente inferiores ao NovoLink ($p=,004$).

(I) SISTEMA	(J) SISTEMA	MEAN DIFFERENCE (I-J)	SIG.
EnVision+	ImmPRESS	-1,033	,337
	UltraVision	-3,000	,000
	NovoLink	-5,100	,000
ImmPRESS.	EnVision+	1,033	,337
	UltraVision	-1,967	,009
	NovoLink	-4,067	,000
UltraVision	EnVision+	3,000	,000
	ImmPRESS	1,967	,009
	NovoLink	-2,100	,004
NovoLink	EnVision+	5,100	,000
	ImmPRESS	4,067	,000
	UltraVision	2,100	,004

Tabela 4 - one-way ANOVA - Tukey HSD.

DISCUSSÃO

Tendo em conta os resultados obtidos podemos verificar que o SA que melhor classificação obtém no nosso estudo é o NovoLink, seguido do UltraVision, depois o ImmPRESS e por fim o EnVision+. Esta conclusão é corroborada pelas imagens de algumas das marcações efectuadas: anti-receptores de progesterona (Imagem 1); anti-cadeias leves Kappa (Imagem 2); anti-CD 8 (Imagem 3) e anti-desmina (Imagem 4).

O SA NovoLink parece ser o mais adequado para aplicação laboratorial em imunocitoquímica, o que encontra concordância no estudo realizado por Skaland e seus colaboradores [11] que, ao comparar vários SA em 12 soros de anticorpos diferentes, concluíram que o SA NovoLink apresentava resultados superiores ao UltraVision.

Ramos-Vara e Miller [12] determinaram que o SA ImmPRESS era mais amplificativo do que o EnVision+, o que também está de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

Outro elemento a referir na nossa reflexão é o contraste, destacando-se que o SA que obtém a melhor classificação é exactamente aquele que fornece o seu próprio contraste (hematoxilina).

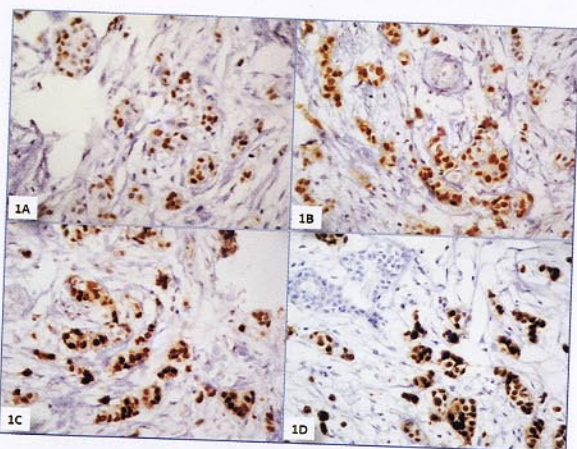


Imagem 1 - Anti-Receptores de Progesterona (A - EnVision+; B - ImmPRESS; C - UltraVision; D - NovoLink), 400x.

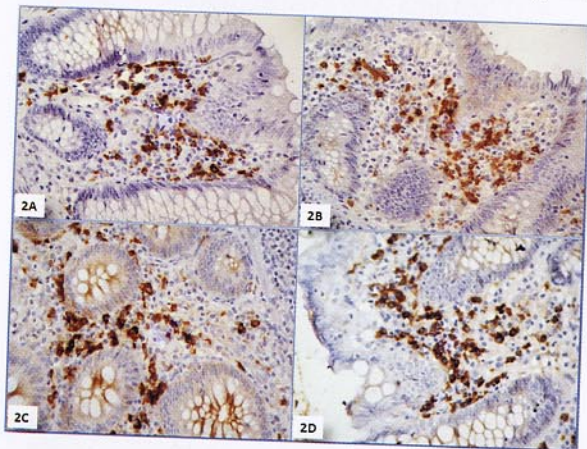


Imagem 2 - Anti-Cadeias leves Kappa (A - EnVision+; B - ImmPRESS; C - UltraVision; D - NovoLink), 400x.

Desta forma, poderá ser útil avaliar até que ponto este elemento é determinante na qualidade final da marcação imunocitoquímica. De acordo com Alves e colaboradores [6], o tempo de fixação das amostras pode ser relevante para a qualidade da reacção. Esta constatação levou-nos a definir que uma das limitações surgidas neste trabalho se prendeu com a impossibilidade de controlo do tempo de fixação das amostras. Sugere-se assim a realização de estudos prospectivos que incluam um controlo das etapas de fixação e processamento. Outra limitação está relacionada com a quantidade relativamente limitada de soros primários utilizados, pelo que se sugere a replicação do estudo aplicando um painel mais vasto dos referidos reagentes.

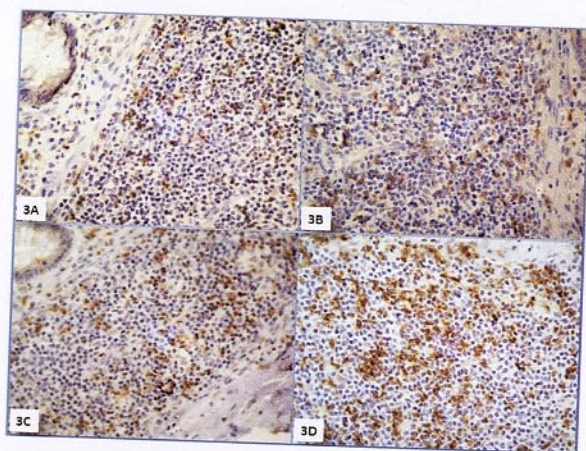


Imagem 3 - Anti-CD 8 (A - EnVision+; B - ImmPRESS; C - UltraVision; D - NovoLink), 400x.

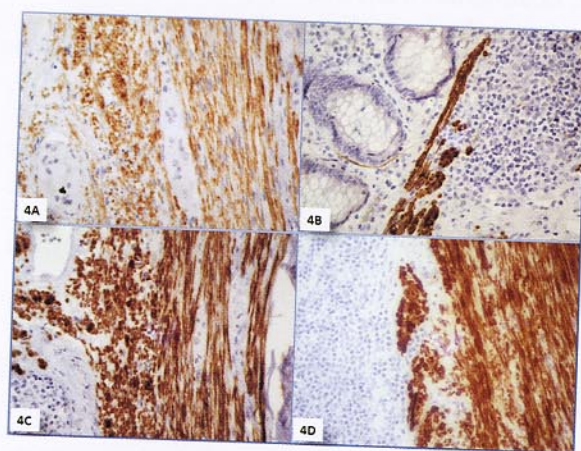


Imagem 4 - Anti-Desmina (A - EnVision+; B - ImmPRESS; C - UltraVision; D - NovoLink), 400x.

AGRADECIMENTOS

A todas as firmas Menarini Diagnósticos Portugal, Baptista Marques, Inopat e Labometer que cederam os seus sistemas de amplificação para o estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. von Wasielewski, R, *et al.* Tyramine Amplification Technique in Routine Immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1997, Vol. Volume 45(11), pp. 1455-1459.
2. Sabattini, E, *et al.* The EnVision++ System: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *Journal of Clinical Pathology*. 1998, Vol. 51, pp. 506-511.
3. Petrosyan, K, Tamayo, R e Joseph, D. Sensitivity of a novel Biotin-free detection reagent (PowerVision+) for immunohistochemistry. *Journal of Histotechnology*. 2002, Vol. 25, pp. 247-250.
4. Kämmerer, U, *et al.* A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001, Vol. Volume 49(5), pp. 623-630.
5. Wiedorn, K, *et al.* EnVision+, a New Dextran Polymer-based Signal Enhancement Technique for In Situ Hybridization (ISH). *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001, Vol. Volume 49(9), pp. 1067-1071.
6. Alves, V, *et al.* Controle de qualidade interlaboratorial em imuno-histoquímica: citoqueratinas e receptor de estrógeno como modelos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2004, Vol. 40 (3).
7. Dako. EnVision™+ Kits. [Online] 2010. [Citação: 10 de Dezembro de 2010.] http://www.dako.com/dist/ar38/p107050/prod_products.htm.
8. Vector laboratories. ImmPRESS Anti-Mouse Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit. [Online] 2010. [Citação: 10 de Dezembro de 2010.] <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?prodID=1629>.
9. Thermo Scientific. UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen . [Online] 2009. [Citação: 10 de Dezembro de 2010.] <http://www.labvision.com/lv.cfm?first=Reagent&second=UltraVision%20LP%20Detection%20System%20HRP%20Polymer%2026%20DAB%20Plus%20Chromogen>.
10. Leica Microsystems. Novocastra Manual Detection Systems. [Online] 2002. [Citação: 10 de Dezembro de 2010.] <http://www.leica-microsystems.com/products/total-histology/novocastra-reagents/detection-systems-buffers/>.
11. Skaland, I, *et al.* Evaluation of 5 different labeled polymer immunohistochemical detection systems. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010, Vol. 18(1), pp. 90-6.
12. Ramos-Vara, JA e Miller, MA. Comparison of two polymer-based immunohistochemical detection systems: ENVISION+ and ImmPRESS. *J Microsc*. Novembro de 2006, Vol. 224(Pt 2), pp. 135-9.