

Introdução

Ferro, A.; Quintino, M.

Em Saúde, todos os dias surgem novas propostas e é necessário que os profissionais estejam em permanente atualização, de modo a maximizarem as tecnologias postas à sua disposição. Os Técnicos de Anatomia Patológica também se incluem neste grupo, estando, portanto, sujeitos às mesmas contingências, evoluindo e adaptando-se, sendo o fruto dessas metamorfoses a melhoria da prestação dos cuidados de saúde. Entre as principais áreas de actuação do Técnico de Anatomia Patológica está a Imunocitoquímica (ICQ), conjunto de técnicas que utilizam as reacções antígeno-anticorpo para a detecção de diversas estruturas celulares, como vírus, bactérias ou proteínas tumorais. Recentemente, tiveram lugar alguns desenvolvimentos ao nível das tecnologias aplicáveis nesta área, com recurso a novas abordagens, das quais se destaca a utilização de radiação por microondas, o que significará um aumento de capacidades de intervenção dos profissionais. As microondas são ondas electromagnéticas semelhantes às ondas de rádio, luz visível ou raios-X, possuindo uma frequência de 100 MHz a 100 GHz. Actuando somente sobre as moléculas polares, como a água, as microondas possuem a capacidade de promover o aquecimento das substâncias por condução da energia produzida por fricção molecular. Este aquecimento pode ser aproveitado em várias situações, nomeadamente em Imunocitoquímica, ao nível da marcação acelerada, da múltipla marcação e das novas técnicas de recuperação antigénica. Com a elaboração deste poster procura-se intervir no sentido de melhorar o conhecimento nas áreas referidas anteriormente, apresentando exemplos da aplicabilidade das microondas em ICQ.

A FÍSICA E A ANATOMIA PATOLÓGICA: AS MICROONDAS EM IMUNOCITOQUÍMICA

Marcação Acelerada

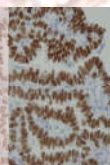
A utilização de incubações em microondas pode acelerar as técnicas de ICQ sem compromisso da qualidade final dos resultados (Gu, 1994). Estão aqui subjacentes dois mecanismos de funcionamento: por um lado há um aumento de temperatura como no aquecimento convencional mas mais rápido e uniforme, e, por outro lado, emerge um aumento da cinética molecular (Boon & Kok, 1992). A chave para esta reacção está em encontrar a temperatura e o tempo ideais para cada tipo de técnica.

De um modo geral o intervalo óptimo de temperatura vai de 25° a 42° C, mas pode ser ajustado com a duração da irradiação, sabendo que existe uma relação inversamente proporcional entre estas grandezas.

Segundo alguns autores (Choi *et al.*, 1995) a técnica ideal consiste na utilização de uma temperatura de 37° C durante 2 a 3 minutos. No entanto a quantidade de energia absorvida pela gota de soro colocada na lâmina é influenciada por diversos outros factores: a sua constituição, volume e a localização da lâmina no forno de microondas. Como estes factores são muito difíceis de controlar é de todo recomendável a utilização de fornos de laboratório com controlo de temperatura por infravermelhos. Por outro lado é importante proceder a pausas de 2 minutos entre irradiações afim de permitir a consolidação da ligação antígeno/anticorpo previamente formada. Todos os passos da técnica podem ser acelerados por irradiação por microondas mas o mais sensível é a da adição do composto enzimático.

Para a aplicação desta técnica à rotina hospitalar é necessário personalizar tempos e temperaturas a cada um dos anticorpos disponíveis de forma a obter os melhores resultados de imunomarcação.

Para finalizar é importante referir que estas técnicas são perfeitamente executáveis mas requerem um trabalho inicial profundo de forma a procurar a estandardização necessária à reprodutibilidade.

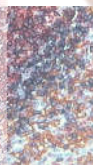
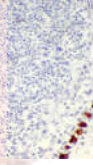


Múltipla Marcação

A imunomarcação de vários antígenos num único corte histológico é um objectivo importante, uma vez que permite, entre outras coisas, o estabelecimento de uma relação topográfica entre os dois ou mais antígenos em causa. No entanto, isto tem sido difícil de alcançar, dada a discutível veracidade dos resultados obtidos com os métodos sequenciais simples, que não garantem uma absoluta independência entre os complexos criados sucessivamente.

Recentemente surgiram alguns avanços ao nível da múltipla marcação recorrendo a desnaturação intercalar com a utilização de forno microondas. A variação proposta é simples e consiste na execução de duas sequências de marcação através de um método sensível como o polímero indirecto, intercaladas por um processamento rápido em forno de microondas (5 minutos a 750watts, em tampão adequado à situação), que desnaturará os complexos anticorpo-antígeno obtidos na primeira sequência, mas não a deposição de cromogénio. Este permanecerá no tecido, podendo ser visualizado simultaneamente com a deposição de cromogénio decorrente da 2ª sequência ICQ. Posteriormente poderá ser realizada nova desnaturação e marcação, até ao limite de cores disponíveis no laboratório para identificação de antígenos. Desta forma garante-se que cada sequência é completamente independente da precedente e também da subsequente, conferindo uma cor distinta a cada antígeno.

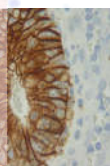
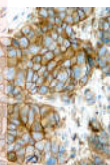
É importante planear de forma adequada cada lâmina, por forma a identificar, em cada caso, antígenos não sobreponíveis em termos de marcação ICQ e relevantes entre si. Normalmente são utilizados os cromogénios: 3,3'-diaminobenzidina (castanho) e 3,3'-diaminobenzidina+Níquel (negro) e 3-amino-9-etilcarbazole (vermelho). Desta forma é possível obter múltiplas marcações em diversos tecidos e para diferentes anticorpos, com um método efectivo, simples e rápido, podendo, assim, contribuir para a generalização e estandardização destas técnicas.



Novas Técnicas de Recuperação Antigénica

A introdução às técnicas de recuperação antigénica com recurso ao aquecimento a alta temperatura das amostras histológicas em soluções específicas foi dada em 1991, por Shi *et al.*, que propôs a utilização do forno de microondas como o método ideal de obtenção de alta temperatura pela sua eficiência e versatilidade. Assim, tornou-se possível reverter o efeito provocado pela utilização da fixação das amostras histológicas em formol que promove a alteração estrutural das proteínas tecidulares e impede o reconhecimento antígeno-anticorpo fundamental para o êxito imunocitoquímico. A especificidade antigénica de diversos anticorpos pode assim ser recuperada o que facilitou o exponencial desenvolvimento do uso da ICQ na obtenção do diagnóstico, prognóstico e indicação terapêutica em Anatomia Patológica.

Desde a sua introdução as técnicas de recuperação antigénica por alta temperatura sofreram diversas adaptações, nomeadamente ao nível da composição da solução de recuperação. As primeiras soluções aquosas baseavam-se na utilização de metais pesados mas, gradualmente, deu-se a substituição destes compostos por agentes quelantes que teórica e empiricamente se apresentaram como mais adequados. Este caminho encontrou sustentação nas descobertas científicas que propuseram um mecanismo de fixação histológica operado pelo formol em colaboração dinâmica com os iões cálcio presentes no tecido (Morgan *et al.*, 1994). O valor de pH da solução de recuperação antigénica também é importante (Shi *et al.*, 1995), sabendo-se que diferentes anticorpos funcionam melhor a diferentes valores de pH. Num estudo posterior, Ferro *et al.* (2003) procuraram demonstrar estatisticamente que as soluções de recuperação antigénica com valores mais elevados de pH (EDTA 1mM, pH 8.0) permitiam resultados finais mais consistentes para a generalidade dos anticorpos. No entanto, apesar destes resultados empíricos, ainda não é completamente claro o mecanismo do efeito do formol nas proteínas tecidulares. Aparentemente o formaldeído potencia uma grande variedade de ligações cruzadas podendo ligar-se a diversos aminoácidos (Shi *et al.*, 2000). Contudo, não está esclarecido se alguma destas reacções é importante no contexto da recuperação antigénica, uma vez que nem sequer está confirmado que as ligações cruzadas promovidas pelo formaldeído são quebradas no decurso deste processo. Em resumo, apesar da existência de algumas lacunas na teorização e comprovação científica, as técnicas de recuperação antigénica são uma mais-valia indispensável ao funcionamento eficiente dos Métodos ICQ.



Considerações finais

Finaliza-se referindo que a aplicação da tecnologia de microondas em ICQ é uma prática fiável e com potencialidades bem vinculadas, à qual devem ser creditados diversos méritos em termos de qualidade e eficiência. No entanto, como em todas as aplicações inovadoras, é necessário um particular cuidado inicial na sua programação e aplicação. Tendo em conta os recentes avanços tecnológicos e a procura de acreditação laboratorial em saúde é possível vaticinar um futuro promissor para a aplicação desta tecnologia, não só em ICQ mas também noutras áreas da Anatomia Patológica.

Boon, M.E. & Kok L.P. (1992). The microwave cookbook of Pathology: the Art of Microscopic Visualization, (3ª ed.). Leiden: Columbia Press.

Chetty R, O'Leary JJ, Gatter KC (1995). Immunocytochemistry as a diagnostic tool. *Current Diagnostic Pathology* 1995; 2: 38-45.

Choi, Y.-S., Whittlesley, M., Slap, S., Anderson, Y., Gu, J. (1995). Advances in temperature control of microwave immunohistochemistry. *Cell Vision* 2:151-164.

Ferro, A.; Geraldes, R.; Lacerda, T. (2003). Soluções de recuperação antigénica: estudo comparativo aprofundado. Comunicação apresentada no IV Congresso Técnico de Anatomia Patológica: Sabugal.

Gu, J. 1994. Microwave immunocytochemistry, p.67-80. In J. Gu and G.W. Hacker (Eds.), *Modern Methods in Analytical Morphology*. New York: Plenum Press.

Morgan J, Navabi H, Schmid K, et al (1994). Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval. *J Pathol*. 1994;174:301-307.

Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991). 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*. Jan; 39(6):741-8.

Shi SR, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR (1995). Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem*. 43: 193-201

Shi S-R, Gu J, Turriero J, et al. (2000). Development of the antigen retrieval technique: philosophical and theoretical bases. In: Shi S-R, Gu J, Taylor C, eds. *Antigen Retrieval Techniques: Immunohistochemistry B: Molecular Morphology*. Natick, MA: Eaton Publishing.