

Carla Sofia Pires Garcia

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA COMO MÉTODO DE DETEÇÃO DA APOPTOSE A NÍVEL CELULAR

Trabalho de Projeto

Mestrado em Tecnologias da Produção Animal



Novembro, 2013

Carla Sofia Pires Garcia

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA COMO MÉTODO DE DETEÇÃO DA APOPTOSE A NÍVEL CELULAR

Trabalho de Projeto

Mestrado em Tecnologias da Produção Animal

Trabalho efetuado sob orientação de

Prof.^a Doutora Helena Vala

Trabalho co-orientado por

Prof. Doutor David Ferreira

Novembro, 2013



Financiado por Programa COMPETE e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia
(COMPETE: FCOMP-01-0124-FEDER-009525)



UNIÃO EUROPEIA
FEDER



“As doutrinas expressas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor”

(texto escrito ao abrigo do novo acordo ortográfico)

***Not everything that counts can be counted.
And not everything that can be counted counts.***
Albert Einstein

À minha princesa, Constança

AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta dissertação gostaria de expressar o meu sincero agradecimento a um conjunto de pessoas que tornaram possível a sua realização.

À Professora Doutora Helena Vala, responsável pelo laboratório de Anatomia Patológica da ESAV e minha orientadora, pela preocupação, colaboração e disponibilidade sempre demonstradas, seja na elaboração deste trabalho ou nas mais diversas rotinas diárias.

Ao Professor Doutor David Ferreira pela disponibilidade na análise do presente documento.

Ao meu marido José Luís, pela dedicação e cuidados redobrados durante este período e à minha filha Constança que, ainda na barriga e, mais tarde, a meu lado, me deu ânimo e força para ultrapassar esta etapa da vida.

Aos meus pais, sempre presentes, pelo apoio demonstrado e a quem devo toda a minha formação e valores.

A todos os meus amigos, pelo apoio e palavras de incentivo sempre manifestados.

RESUMO

A apoptose constitui um processo fisiológico de morte celular, caracterizado por alterações morfológicas distintas e mecanismos bioquímicos e moleculares bem definidos. O seu papel de destaque em numerosos eventos biológicos e importantes processos patológicos conduziu a um crescente interesse na investigação dos mecanismos celulares que regulam o processo apoptótico. A aplicação de metodologias capazes de identificar células apoptóticas despoletou um enorme desenvolvimento de técnicas. No entanto, as propriedades demonstradas por estes ensaios nem sempre se aplicam ao estudo de amostras tecidulares, pelo que a escolha dos diferentes métodos deverá ser criteriosamente avaliada, tendo em conta a aplicação pretendida e as alterações morfológicas que se pretendem detetar.

Das várias técnicas disponíveis para deteção da apoptose em tecidos, muitos investigadores recomendam o método TUNEL, o qual se baseia na marcação de produtos endonucleossómicos resultantes da fragmentação do DNA. Outros métodos histoquímicos também disponíveis incluem a deteção do citocromo c, libertado da mitocôndria ou a deteção das proteínas pró e anti-apoptóticas, Bax, Bid e Bcl-2, envolvidas nos mecanismos intrínsecos da apoptose. Mais recentemente, a marcação de produtos específicos resultantes da clivagem de proteínas alvo pelas caspases, tem vindo a ser considerada uma abordagem promissora.

Como principal objectivo deste trabalho pretendeu-se avaliar a técnica imunohistoquímica como método de deteção da apoptose a nível celular, em tecidos animais, tendo por base o método TUNEL, o qual permite a deteção de fragmentos de DNA. Os resultados obtidos permitiram concluir que, apesar do método TUNEL possuir as suas limitações ao nível da sensibilidade e especificidade, o mesmo constitui um mecanismo imunohistoquímico útil na deteção de células apoptóticas. Contudo, segundo opinião de vários autores, adverte-se para a necessidade da aplicação de pelo menos dois métodos imunohistoquímicos como forma de validar a ocorrência do processo apoptótico, razão pela qual se optou pela deteção do citocromo c citosólico como método complementar, uma vez que a sua libertação para o espaço citosólico se encontra implicada na ativação da apoptose.

Palavras-chave: apoptose, imunohistoquímica, tecidos parafinados, TUNEL, Citocromo c.

ABSTRACT

Apoptosis is a physiological cell death process characterized by distinctive morphological changes and biochemical and molecular mechanisms well defined. His leading role in many important biological events and pathological processes has led to a growing interest in investigating the cellular mechanisms that regulate the apoptotic process. The application of methodologies, capable of identifying apoptotic cells, triggered a huge development of techniques. However, the properties shown by these assays do not always apply to the study of tissue samples, whereby the choice of different methods must be carefully evaluated, taking into account the intended application and the morphological changes that are intended to detect.

Of the various available techniques for detection of apoptosis in tissues, many investigators recommend the TUNEL method, which is based on the labeling of endonucleosomal products resulting from DNA fragmentation. Other methods available include histochemical detection of cytochrome c release from mitochondria or detection of proteins pro-and anti-apoptotic Bax, Bid and Bcl-2, involved in the intrinsic mechanisms of apoptosis. More recently, the marking of specific products resulting from cleavage by caspases target proteins, has been regarded as a promising approach.

The main objective of this work intended to evaluate the immunohistochemical technique as a method for detection of apoptosis at cellular level, in animal tissues, based on TUNEL method, which allows the detection of DNA fragments. The results showed that, despite the TUNEL method has its limitations in terms of sensitivity and specificity, it constitutes a mechanism useful for immunohistochemical detection of apoptotic cells. However, according to the opinion of several authors, attention is drawn to the need to apply, at least, two immunohistochemical methods as a way to validate the occurrence of apoptosis, so, for that reason, we opted for the detection of cytosolic cytochrome c as a complementary method, since their release into the cytosolic space is implicated in the activation of apoptosis.

Keywords: apoptosis, immunohistochemistry, paraffin embedded tissues, TUNEL, Cytochrome c.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE GERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	Xii
ÍNDICE DE QUADROS	XIV
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. MECANISMOS DE MORTE CELULAR	4
2.1. Apoptose, necrose e autofagia.....	4
2.2. Bases moleculares da apoptose.....	8
2.2.1. O processo apoptótico.....	8
2.2.1.1. Caspases como elementos iniciadores e executores da apoptose.	8
2.2.1.2. Vias de ativação da apoptose.....	10
2.2.1.2.1. Via extrínseca (citoplasmática).....	11
2.2.1.2.2. Via intrínseca (mitocondrial).....	13
2.3. Métodos para deteção da apoptose.....	15
2.3.1. Ativação das caspases.....	16
2.3.1.1. Citoqueratina, citoesqueleto e apoptose.....	17
2.3.2. Alterações de membrana.....	18
2.3.3. Fragmentação do DNA.....	20
2.3.4. Ensaio mitocondriais.....	22
2.3.5. Deteção em peças inteiras.....	24
2.3.6. Alterações citomorfológicas.....	24

3. ASPETOS TÉCNICOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA.....	26
3.1. Breve resumo histórico.....	26
3.2. Aplicações e importância.....	28
3.3. Limitações, dificuldades e problemas associados à imunohistoquímica.....	29
3.3.1. Fatores pré-analíticos.....	30
3.3.2. Fatores analíticos.....	32
3.3.3. Fatores pós-analíticos.....	33
3.4. Métodos de recuperação antigénica.....	34
3.4.1. Tratamentos mediados pelo calor.....	34
3.4.2. Digestão enzimática.....	35
3.5. Seleção de anticorpos.....	37
3.5.1. Anticorpos policlonais.....	37
3.5.2 Anticorpos monoclonais.....	39
3.6. Métodos imunohistoquímicos.....	41
3.6.1. Método de deteção por imunofluorescência.....	42
3.6.1.1. Imunofluorescência direta.....	42
3.6.1.1.1. Vantagens e desvantagens.....	43
3.6.1.2. Imunofluorescência indireta.....	43
3.6.1.2.1. Vantagens e desvantagens.....	44
3.6.2. Métodos de deteção imunoenzimática.....	45
3.6.2.1. Sistemas de deteção diretos.....	46
3.6.2.2. Sistemas de deteção indiretos.....	46
3.6.2.2.1. Simples.....	46
3.6.2.2.2. Método PAP (peroxidase anti-peroxidase).....	47

3.6.2.2.3. Método APAAP (alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase).....	48
3.6.2.3. Sistemas Avidina-Biotina.....	48
3.6.2.4. Sistema do polímero.....	51
3.6.2.5. Sistema de amplificação da tiramina.....	53
3.6.3. Cromogénios.....	55
3.6.4. Validação de resultados.....	56
3.6.4.1. Controlos.....	56
3.6.4.2. Marcação inespecífica/Marcação de fundo e suas principais causas.....	57
3.6.4.2.1. Atividade da peroxidase endógena.....	57
3.6.4.2.2. Atividade da fosfatase alcalina endógena.....	58
3.6.4.2.3. Atividade das proteínas Avidina e Biotina.....	59
3.6.4.2.4. Interações hidrofóbicas das proteínas.....	60
3.6.4.2.5. Interações iónicas e eletrostáticas.....	62
3.6.4.2.6. Pigmentos.....	63
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
4.1. Amostras recolhidas.....	65
4.2. Metodologia.....	65
4.2.1. Preparação das amostras.....	65
4.2.2. Imunohistoquímica.....	66
4.2.2.1. TUNEL.....	66
4.2.2.2. Citocromo C.....	68
5. RESULTADOS.....	70
5.1. Avaliação da imunomarcação pelo método TUNEL.....	70

5.1.1. Intestino.....	70
5.1.2. Rim.....	72
5.2. Avaliação da imunomarcação pelo Citocromo c.....	73
5.2.1. Intestino.....	73
5.2.2. Rim.....	75
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÕES.....	83
8. BIBLIOGRAFIA.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principais mecanismos de morte celular.....	7
Figura 2. Mecanismos de ativação da apoptose.....	11
Figura 3. Via extrínseca de ativação da apoptose (recetores de morte).....	12
Figura 4. Via intrínseca de ativação da apoptose (mitocondrial).....	14
Figura 5. Métodos para deteção da apoptose.....	16
Figura 6. Sequência de aminoácidos da região Linker 1-2 do domínio central dos diferentes membros da família IF.....	17
Figura 7. Princípio do método de fragmentação de DNA – TUNEL.....	21
Figura 8. Diagnóstico histogenénico de neoplasias usando a técnica de imunohistoquímica.....	28
Figura 9. Expressão da heparanase no diagnóstico de tumores carcinóides broncopulmonares.....	29
Figura 10. Representação esquemática de anticorpos policlonais.....	38
Figura 11. Processo de produção de anticorpos policlonais.....	38
Figura 12. Representação esquemática de anticorpos monoclonais.....	40
Figura 13. Processo de produção de anticorpos monoclonais.....	40
Figura 14. Imunofluorescência direta e indireta.....	43
Figura 15. Método direto e indireto de uma reação de imunoperoxidase.....	4
Figura 16. Método indireto peroxidase-antiperoxidase (PAP).....	47
Figura 17. Método imunohistoquímico através do complexo ABC e do complexo LSAB.....	50
Figura 18. Método indireto através do polímero.....	52
Figura 19. Método de amplificação da tiramina.....	53
Figura 20. Atividade da peroxidase endógena antes e após tratamento com peróxido de hidrogénio a 3%.....	58

Figura 21. Atividade da fosfatase alcalina endógena antes e após tratamento com levamisole.....	59
Figura 22. Bloqueio de fundo não específico através de soro normal.....	62
Figura 23. Reação positiva débil (+) em 75-100% das células epiteliais das vilosidades intestinais. TUNEL.....	70
Figura 24. Reação positiva moderada (++) em 75-100% das células epiteliais das vilosidades intestinais. TUNEL.....	71
Figura 25. Reação positiva intensa em A) 75-100% e B) 0-25% das células epiteliais das vilosidades intestinais. TUNEL.....	71
Figura 26. Reação positiva muito intensa (++++) em 0-25% das células epiteliais das vilosidades intestinais. TUNEL.....	71
Figura 27. Tubulos contornados proximais do rim com A) imunoreação positiva débil (+) em 75-100% das células epiteliais e B) imunoreação positiva moderada (++) em 75-100% das células epiteliais. TUNEL.....	72
Figura 28. Tubulos contornados proximais do rim com A) imunoreação positiva intensa (+++) em 75-100% das células epiteliais e B) tubulos contornados distais do rim com imunoreação positiva muito intensa (++++) em 75-100% das células epiteliais. TUNEL.....	72
Figura 29. Imunoreação positiva moderada (++) em A) 75-100% das células epiteliais dos tubulos coletores e B) imunoreação positiva muito intensa (++++) em 75-100% das células epiteliais dos tubulos coletores, intensa (+++) nas células epiteliais do segmento espesso da ansa de Henlé. TUNEL.....	73
Figura 30. Reação positiva muito intensa (++++) em 75-100% das células epiteliais das vilosidades intestinais. Citocromo C.....	73
Figura 31. Reação positiva moderada (++) em 75-100% das células epiteliais das vilosidades intestinais. Citocromo C.....	74
Figura 32. Reação positiva A) moderada (++) e B) intensa (+++) em 75-100% das células glandulares da mucosa. Citocromo C.....	74
Figura 33. Reação positiva A) moderada (++) em 25-50% das células epiteliais das glândulas mucosas e B) intensa (+++) em 75-100% das células dos gânglios nervosos da submucosa. Citocromo C.....	74
Figura 34. Reação positiva A) muito intensa (++++) em 75-100% das células epiteliais dos tubulos contornados distais do rim e B) moderada (++) em 75-100% das células epiteliais dos tubulos contornados proximais do rim. Citocromo C.....	75

Figura 35. Reação positiva A) moderada (++) nas células epiteliais dos tubulos coletores do rim (inferior a 25% das células) e B) reação positiva muito intensa (++++) em 100% das células epiteliais do segmento espesso da ansa de Henlé. Citocromo C. 75

Figura 36. A) e B) Reação negativa nos glomérulos. Citocromo C. 76

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Classificação das caspases nos mamíferos e respetiva representação do domínio efetor de morte (DED) nas caspases – 8 e 10 e do domínio de ativação e recrutamento (CARD) nas caspases -1, -2, -4, -5 e -9..... 9

Quadro 2. Vantagens dos anticorpos monoclonais e policlonais..... 41

Quadro 3. Localização da expressão dos marcadores TUNEL e Citocromo c..... 76

1. INTRODUÇÃO

A apoptose, também designada de morte celular programada, constitui um processo fisiológico fundamental ao desenvolvimento dos seres vivos, garantindo o mecanismo homeostático essencial à manutenção das populações celulares que formam os tecidos (Meier *et al.*, 2000). Desta forma, a sua regulação adquiriu uma importância central em vários aspetos biológicos, incluindo estudos embrionários, processos patogénicos de doenças, resposta celular a administrações terapêuticas, tornando-se a deteção precisa da apoptose um processo crucial no desenvolvimento destes estudos biomédicos (Wyllie, 1992). Considerando todas as observações morfológicas que distinguem a apoptose da necrose, o campo de pesquisa associado ao processo de morte celular tem sido objeto de um crescente interesse, originando uma riqueza de conhecimento acerca dos mecanismos genéticos e bioquímicos que regulam este processo (Barrett *et al.*, 2001). A necessidade de métodos histoquímicos como forma de avaliar a morte celular, especialmente em tecidos, levou ao desenvolvimento de diversas técnicas, as quais, presentemente, são aplicadas de forma extensiva a estudos fisiológicos e de desenvolvimento, assim como a uma grande variedade de eventos patológicos (Wyllie, 1992).

Os mecanismos que regulam o processo apoptótico ocorrem como resposta a uma grande variedade de estímulos, suportados por duas grandes vias de ativação. A via extrínseca, envolvendo a participação dos chamados recetores de morte, localizados na superfície celular, e a via intrínseca, envolvendo a presença das mitocôndrias, através da indução da perda de integridade da membrana mitocondrial externa, levando à libertação do citocromo c para o citosol. Estas duas grandes vias determinam a ativação de uma família específica de proteases citoplasmáticas designadas por caspases, responsáveis por desencadear todos os mecanismos que conduzem às alterações morfológicas e bioquímicas da apoptose (Willingham, 1999).

Um grande e, muitas vezes, inapreciado aspeto da morte celular por apoptose reside na assíncronia do processo. Esta deriva do facto das células de uma determinada população celular, após a receção de um estímulo iniciador, poderem desencadear o processo em diferentes intervalos de tempo, levando a que a duração dos vários estádios de alterações morfológicas apoptóticas possam variar

de célula para célula. Alguns ensaios detetam alterações morfológicas que ocorrem em fases precoces do processo, enquanto outros apenas são capazes de detetar fases mais tardias de apoptose. Adicionalmente, a lise que eventualmente ocorre no final da apoptose, corresponde essencialmente ao mesmo evento de perda de integridade de membrana verificado no processo de necrose, embora as alterações específicas decorridas até esse ponto sejam muito diferentes. Estes constrangimentos apontam para a necessidade de uma análise ponderada de toda a cinética e sincronia do sistema, assim como para a escolha apropriada dos ensaios que permitem detetar com precisão todas as alterações morfológicas (Willingham, 1999).

Para secções de tecido, muitos investigadores recomendam a detecção de fragmentos de DNA através das técnicas TUNEL (“Terminal Dntp Nick End-Labeling”) ou ISNT (“In situ Nick Translation”), em conjunto com observações morfológicas nucleares (Barrett *et al.*, 2001). Embora a detecção de quebras na cadeia de DNA constitua um método de base para uso em secções de tecido, torna-se necessário um rigoroso cuidado na sua interpretação, pois existem problemas de especificidade associados a estas técnicas (Willingham, 1999; Barrett *et al.*, 2001).

Outro método histoquímico também utilizado para detecção da apoptose consiste na marcação, através da Anexina V, da fosfatidilserina exposta para o exterior da membrana plasmática das células apoptóticas. Embora este método seja capaz de detetar a apoptose num estado anterior às técnicas TUNEL e ISNT, apenas uma minoria de células apoptóticas são marcadas pela Anexina V antes da lise celular verificada no final do processo apoptótico (Barrett *et al.*, 2001).

Mais recentemente tem vindo a ser demonstrada a eficácia de um anticorpo capaz de detetar fragmentos específicos resultantes da clivagem da citoqueratina 18 pelas caspases. Para além de detetar, com elevada especificidade, células apoptóticas em culturas celulares, demonstrou também resultados favoráveis na utilização de secções de tecido. A citoqueratina 18 apenas é expressa em determinados tipos celulares (epitélios simples), tornando assim limitada a aplicação deste anticorpo. Outros métodos que incluem a ativação das caspases (como por exemplo, caspase 3) poderão garantir maior aplicabilidade (Barrett *et al.*, 2001).

Encontram-se também disponíveis estudos mitocondriais capazes de monitorizar o processo apoptótico, os quais se baseiam na expressão de

determinadas moléculas, tais como o citocromo c libertado para o citosol, ou a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas, permitindo a detecção de fases iniciais da via intrínseca da apoptose (Bedner *et al.*, 1999; Darzynkiewicz *et al.*, 1999).

Assim, a seleção do método de detecção da apoptose em células, tecidos ou órgãos deve ser cautelosamente avaliada, ponderando as vantagens e os inconvenientes associados a cada método. Como consequência, o desenvolvimento de novas técnicas terá de confrontar as muitas facetas de apenas um único, apesar de complexo, mecanismo biológico (Willingham, 1999).

Dada a importância do processo apoptótico e, conseqüentemente, dos seus mecanismos biológicos regulatórios, pretendemos, com o presente trabalho, desenvolver métodos imunohistoquímicos capazes de detetar eventos apoptóticos a nível celular, em tecidos animais. A detecção pelo método TUNEL, o qual permite a avaliação dos produtos endonucleossómicos resultantes da fragmentação do DNA, constituiu o método escolhido. Contudo, dadas as limitações que apresenta ao nível da sensibilidade e especificidade, vários autores consideram a aplicação de um segundo método como forma de validar a ocorrência do processo apoptótico, razão pela qual se optou pela avaliação da expressão do citocromo c citosólico, uma vez que o mesmo se encontra descrito como um fator necessário para ativação da apoptose.

2. MECANISMOS DE MORTE CELULAR

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares integram processos dependentes da interação entre as células que os constituem. Durante o desenvolvimento embrionário, muitas células são produzidas em excesso com o objetivo de conduzir à formação de órgãos e tecidos, no entanto, mecanismos como a morte celular programada atuam como que esculpindo os tecidos em questão, mantendo um equilíbrio homeostático entre as populações celulares (Meier *et al.*, 2000). Uma vez que a morte celular se encontra intimamente ligada à homeostase dos tecidos, este processo tem sido, não surpreendentemente, implicado em numerosos estados patológicos. Anomalias ocorridas ao nível da regulação da morte celular podem constituir um fator significativo em determinadas doenças, tais como cancro, síndromes autoimunes, SIDA, isquémia, doenças hepáticas e certos distúrbios neurodegenerativos (Fischer & Schulze-Osthoff, 2005).

2.1. APOPTOSE, NECROSE E AUTOFAGIA

De acordo com as suas características morfológicas e bioquímicas, os processos de morte celular podem classificar-se em vários tipos, destacando-se com maior importância, a apoptose, a necrose e a autofagia. No entanto, existem dois outros eventos pelos quais as células perdem as suas capacidades funcionais, nomeadamente através da mitose catastrófica e da senescência (Okada & Mak, 2004; Castedo *et al.*, 2004).

As células possuem várias opções de morte celular, sendo a apoptose apenas uma em particular, contudo considerada por muitos como o mais importante mecanismo de morte celular.

A apoptose, também conhecida como “morte celular programada”, ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogénese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular causado por agentes genotóxicos (Ranganath & Nagashree, 2001).

A apoptose desenvolve-se através de uma série de eventos morfológicos bem coordenados (Figura 1A). De um modo geral, é um fenómeno que ocorre de

forma muito rápida, iniciando-se com a retração da célula e consequente perda de aderência com a matriz extracelular e células circundantes. Com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar rutura da membrana externa, as organelas celulares preservam a sua morfologia. A cromatina sofre condensação e concentra-se junto à membrana nuclear, a qual permanece intacta. Seguidamente, a membrana celular forma prolongamentos, denominados “blebs”, ocorrendo desintegração do núcleo em pequenos fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular rompem, dando origem a estruturas celulares designadas por corpos apoptóticos, as quais envolvem organelas intactas, assim como porções do núcleo. Estas estruturas são rapidamente reconhecidas, sendo fagocitadas por macrófagos ou por células vizinhas e removidas sem causar uma resposta inflamatória (Kerr *et al.*, 1972; Ziegler & Groscurth, 2004).

O conceito de apoptose foi inicialmente descrito na década de setenta por Kerr, Wyllie e Currie, baseado em estudos de morte celular fisiológica. Estes investigadores propuseram a ideia de que a apoptose constitui um mecanismo para eliminação ou deleção de células, programado durante o desenvolvimento celular, sugerindo a existência de algum tipo de relógio molecular interno responsável pelo desencadeamento da morte celular, indiferentemente aos sinais subjacentes. Atualmente, estudos comprovam a existência de inúmeros fatores externos capazes de danificar o DNA, tais como radiações X e raios UV, agentes quimioterapêuticos e várias toxinas (Guerrero & Arias, 1998).

A apoptose define-se como um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, requerendo a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas resultam como consequência de uma série específica de mecanismos moleculares e bioquímicos geneticamente regulados (Saraste & Pulkki, 2000).

A necrose, por sua vez, é por muitos considerada como um processo acidental e descontrolado de morte celular. Em termos bioquímicos, as principais características associadas a este processo incluem uma depleção energética massiva, a formação de espécies oxigénio-reativas e a ativação de proteases não apoptóticas. Todos estes eventos culminam na perda da função homeostática da bomba de iões e na degradação da membrana lipídica, levando à tumefação e

consequente rutura da membrana celular. As células necróticas apresentam um típico acréscimo do volume celular, condensação moderada da cromatina, desorganização do citoplasma com dilatação das organelas celulares (mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi), perda da integridade da membrana e consequente rutura (Figura 1B) (Festjens *et al.*, 2006). Durante este processo, o conteúdo celular é libertado, causando danos às células vizinhas, promovendo no local uma reação inflamatória (Ziegler & Groscurth, 2004). A necrose é considerada como uma resposta passiva a um efeito celular prejudicial, no entanto, estudos recentes sugerem que este processo possa ser regulado mediante controlo genético, facto que pode ser relevante em múltiplos processos fisiológicos e patológicos (Zong & Thompson, 2006; Festjens *et al.*, 2006).

O processo de autofagia define-se como sendo um processo adaptativo conservado evolutivamente e controlado geneticamente. Ocorre como resposta a um estado de stress metabólico, resultando na degradação dos componentes celulares através do processo lisossómico. O mecanismo mais conhecido de autofagia envolve a formação de uma membrana em torno de porções do citoplasma, originando estruturas vesiculares denominadas por autofagossomos (Figura 1C). De seguida, as vesículas resultantes fundem-se com um lisossoma e, por intermédio das hidrolases lisossomais, o seu conteúdo é degradado (Danial & Korsmeyer, 2004; Kelekar, 2005; Lum *et al.*, 2005).

A mitose catastrófica, em geral, não é considerada uma forma de morte, mas sim uma sinalização irreversível para a morte. Trata-se de um processo passivo que envolve uma mitose aberrante, resultando numa segregação cromossómica errada (Weaver & Cleveland, 2005).

Por último, a senescência trata-se de um processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento, o qual ocorre mediante programação genética, envolvendo a deterioração dos telómeros e a ativação de genes supressores tumorais. As células sujeitas a este processo, após um determinado número de divisões celulares, entram em senescência e perdem a sua capacidade proliferativa (Mooi & Peeper, 2006).

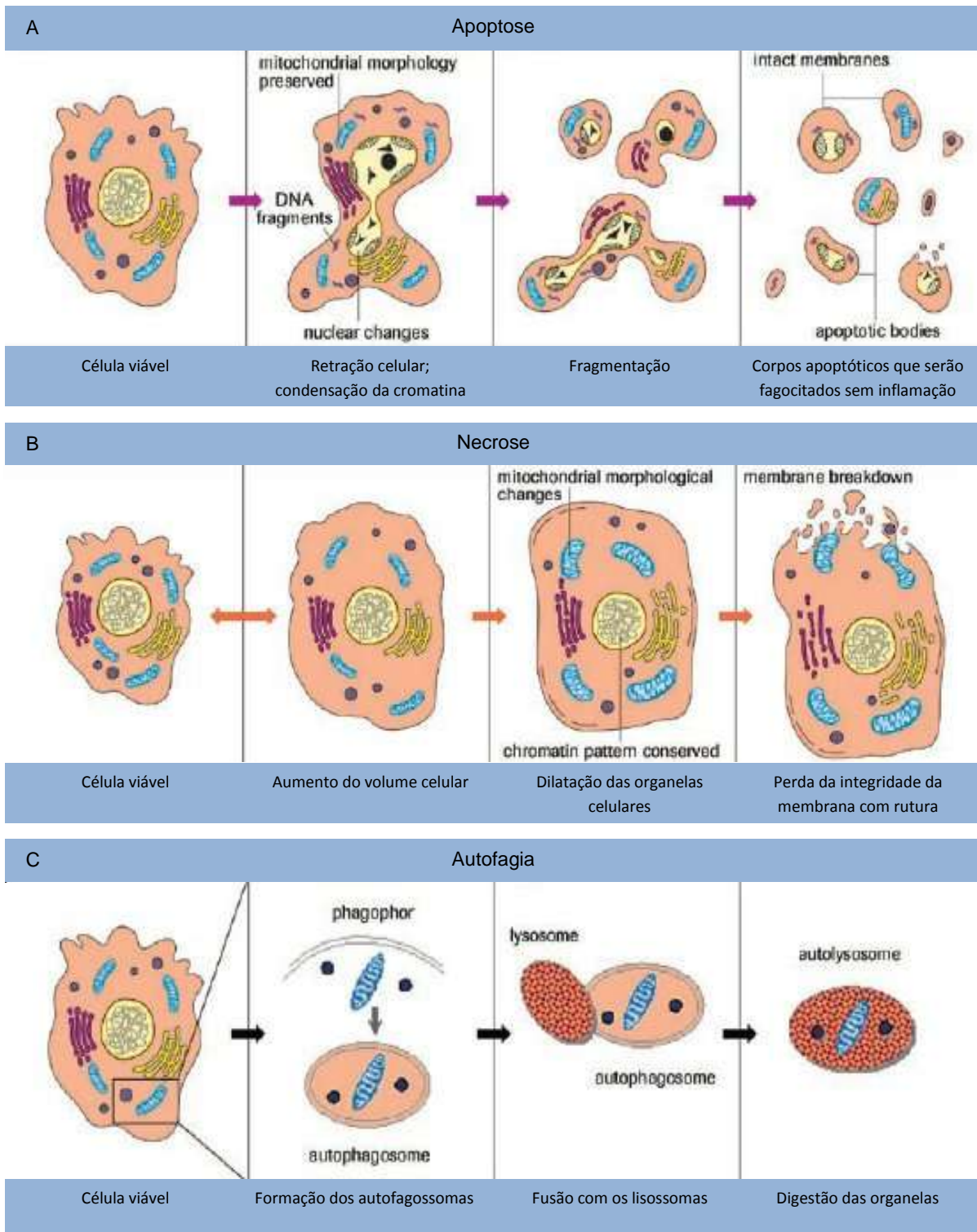


Figura 1. Principais mecanismos de morte celular: apoptose, necrose, autofagia.

A) As células apoptóticas revelam alterações características na morfologia nuclear, incluindo condensação e fragmentação da cromatina, retração celular, emissão de prolongamentos citoplasmáticos e formação de corpos apoptóticos contendo material nuclear ou citoplasmático. B) A necrose é morfologicamente definida por um inchaço citoplasmático e dilatação das organelas, com consequente vacuolização celular e rutura da membrana plasmática com extravasamento do conteúdo intracelular. C) A autofagia envolve a acumulação massiva de uma membrana dupla em torno de uma região destino da célula, separando o conteúdo do resto do citoplasma, formando os chamados autofagossomas. Estes fundem-se com os lisossomas para formar os autolisossomas que, por intermédio de hidrolases promovem a degradação do seu conteúdo (Adaptado de Schulze-Osthoﬀ. 2008).

2.2. BASES MOLECULARES DA APOPTOSE

2.1.1. O PROCESSO APOPTÓTICO

Ainda que qualquer uma das formas de morte celular assuma a sua relevância, a abordagem deste trabalho inclui um maior enfoque no processo apoptótico.

A apoptose resulta de um colapso da estrutura celular através de uma digestão proteolítica interna, originando desintegração do citoesqueleto, distúrbios metabólicos e fragmentação genómica (Taylor *et al.*, 2008). Uma família de proteases conhecidas como caspases (*cystein-dependent aspartate-specific proteases*) possui a capacidade de clivar substratos que contenham resíduos de aspartato e constitui o motor central da apoptose, encontrando-se envolvidas nas fases de iniciação, execução e regulação do mecanismo apoptótico (Los *et al.*, 1999).

2.2.1.1. CASPASES COMO ELEMENTOS INICIADORES E EXECUTORES DA APOPTOSE

Até ao momento, foram identificadas 14 diferentes caspases em mamíferos (Boatright & Salvensen, 2003), onze das quais em humanos, possuindo uma estrutura semelhante na forma de proenzimas. Basicamente, são constituídas por um segmento N-terminal, também designado por pró-domínio (longo nas caspases iniciadoras-p20 e curto nas caspases efetoras-p10) e por duas subunidades, uma longa e uma curta, que possuem as sequências que participam no domínio catalítico (Sambade, 2005).

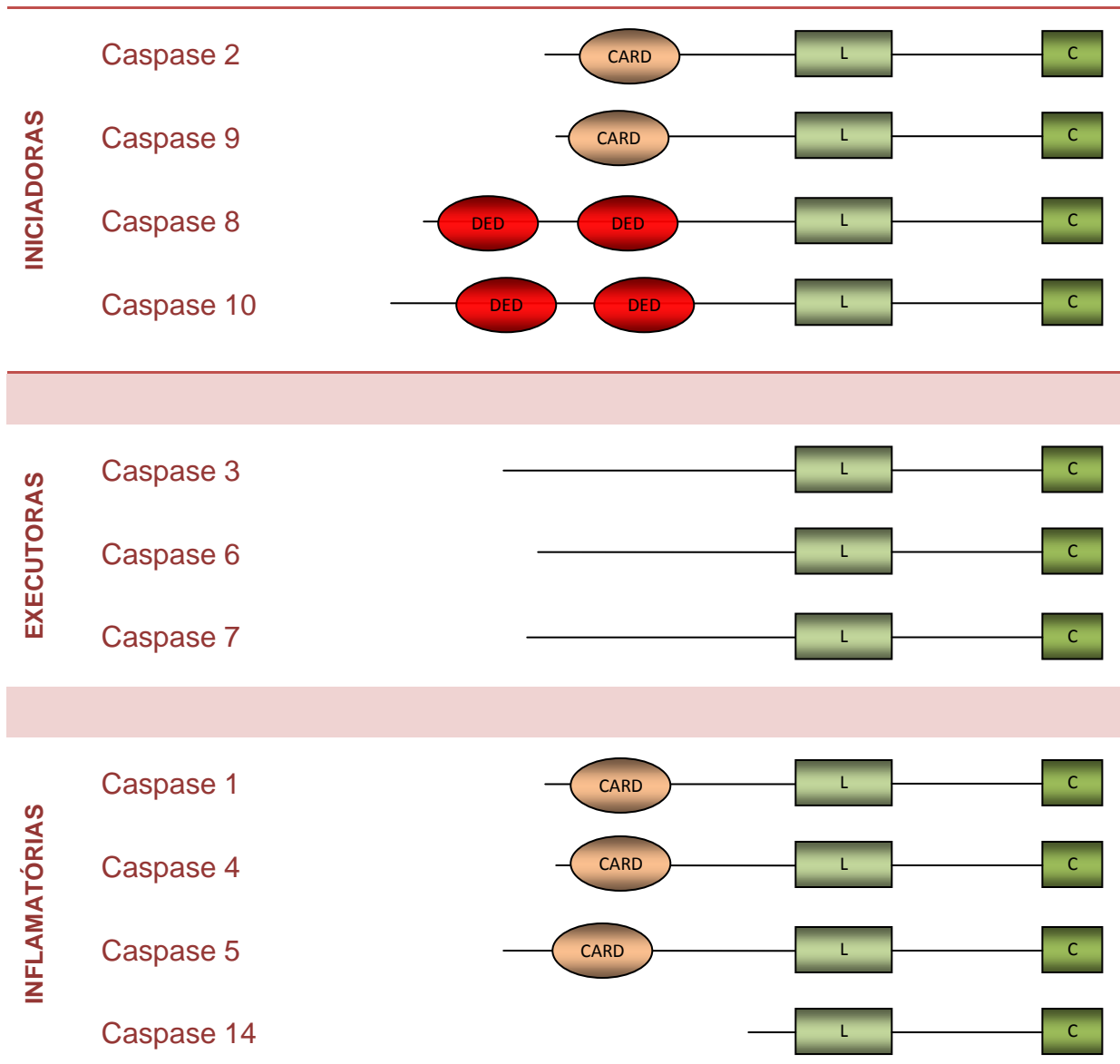
De acordo com a sua estrutura (Quadro 1) e o seu papel na apoptose, as caspases podem ser classificadas em:

Caspases iniciadoras da apoptose: caspases que possuem pró-domínios longos, encontrando-se envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Incluem as que pertencem ao domínio efetor de morte (DED), caspases -8 e -10, e as caspases do domínio de ativação e recrutamento (CARD), caspases -2 e -9 que vão mediar a interação na direção das moléculas adaptadoras.

Caspases efetoras/executoras da apoptose: incluem as caspases -3, -6 e -7, constituindo caspases que possuem pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis por darem continuidade ao processo apoptótico através da clivagem de substratos celulares, após ativação por parte das caspases iniciadoras (Rupnarain *et al.*,2004; Jin & El-Deiry, 2005).

Caspases inflamatórias: incluem as caspases -1, -4, -5, -11, -12, -13 e -14, encontrando-se envolvidas na inflamação e a sua contribuição na apoptose permanece não esclarecida.

Quadro 1. Classificação das caspases nos mamíferos e respetiva representação do domínio efetor de morte (DED) nas caspases – 8 e 10 e do domínio de ativação e recrutamento (CARD) nas caspases -1, -2, -4, -5 e -9. L e C correspondem às subunidades longa e curta, existentes em todas as caspases (Adaptado de Jin e El-Deiry, 2005).



Uma vez ativadas, as caspases efetoras clivam aproximadamente cerca de 400 substratos, incluindo proteínas envolvidas na estrutura do citoplasma, proteínas reguladoras dos sinais de transdução e transcrição, componentes controladores do ciclo celular e proteínas envolvidas na replicação e reparação do DNA. Para muitos dos substratos identificados, as consequências funcionais da sua clivagem são desconhecidas e têm sido simplesmente inferidas nas suas normais funções. Em outros casos, a proteólise de determinados componentes pode ser associada a alterações morfológicas discretas (Fisher *et al.*, 2003).

Mais ainda, as caspases são responsáveis pela destruição de muitas proteínas responsáveis pela manutenção da arquitetura do citoesqueleto, nomeadamente as chamadas citoqueratinas 8 e 18, principais componentes dos filamentos intermediários. Contudo, a ativação das caspases não é necessariamente sinónimo de morte celular; ou seja, por um lado, é evidente que as células podem sobreviver sob ativação limitada das caspases, sendo que, reciprocamente, esta inibição das caspases provoca um bloqueio das alterações morfológicas da apoptose, muitas vezes sem influenciar a morte celular final (Chipuk e Green, 2005). Por outro lado, determinadas caspases encontram-se envolvidas em processos regulatórios da inflamação, controlando a maturação de precursores de citoquinas. Para além da sua função na morte celular, as caspases podem também participar em diversos processos não apoptóticos, controlando mecanismos de proliferação e diferenciação celular (Schwerk & Schulze-Osthoff, 2003; Kuranaga & Miura, 2007).

2.2.1.2. VIAS DE ATIVAÇÃO DA APOPTOSE

Os fatores desencadeadores de apoptose são diversos, destacando-se entre eles: ligação de moléculas a recetores de membrana, agentes quimioterapêuticos, radiação ionizante, danos estruturais do DNA, choque térmico, deficiente quantidade de nutrientes, privação de fatores de crescimento e níveis aumentados de espécies reativas de oxigénio (Hengartner, 2000).

A mais estudada via de sinalização da apoptose é a cascata apoptótica. Esta pode ser iniciada por duas diferentes vias de sinalização, respetivamente pela via extrínseca (citoplasmática), através de recetores específicos localizados na superfície celular, denominados recetores de morte ou, por via intrínseca, mediante

estímulos internos de stress intracelular (mitocondrial) (Figura 2). Estas diferentes vias culminam na ativação das caspases presentes no citoplasma, sob a forma de proenzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica ao nível dos resíduos de ácido aspártico (Green & Reed, 1998; Parolin & Reason, 2001; Amarante-Mendes, 2003).

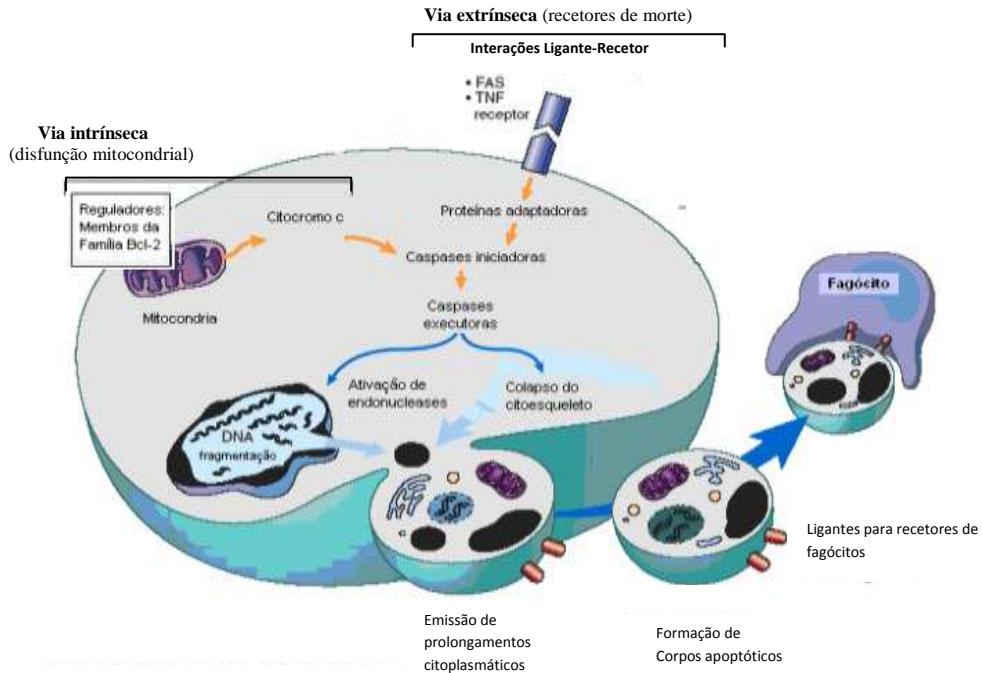


Figura 2. Mecanismos de ativação da apoptose

As duas vias de sinalização da apoptose diferem nos mecanismos que envolvem a sua indução e regulação, culminando ambas na ativação das caspases executoras. A ativação destas caspases pela via mitocondrial e/ou recetores de morte envolve a ação de endonucleases e proteases que degradam proteínas nucleares e do citoesqueleto, originando uma cascata de degradação intracelular que inclui a fragmentação genómica e a desintegração do citoesqueleto. Os corpos apoptóticos resultantes, contendo organelas intactas e outros componentes citosólicos, são reconhecidos e rapidamente fagocitados (Adaptado de Kumar *et al.*, 2010).

2.2.1.2.1. VIA EXTRÍNSECA (CITOPLASMÁTICA)

Nesta via de sinalização, o sinal é desencadeado pela interação de ligantes específicos a um grupo de recetores de membrana, designados como recetores de morte. A grande maioria destes recetores pertencem à superfamília de recetores para o fator de necrose tumoral (TNF-R), os quais possuem uma região extracelular rica em cisteína e uma região citoplasmática chamada domínio de morte ("death

domain – DD”), importante para transdução intracelular do sinal apoptótico e ativação imediata da cascata de caspases (Gupta, 2003).

Os recetores de morte mais conhecidos incluem citocinas, tais como TNF-R1 (cujo ligante específico se designa por TNF- α) e Fas (cujo ligante específico é normalmente designado por Fas ligante, FasL, uma citocina produzida pelas células do sistema imune). Quando os recetores de morte reconhecem o ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD (“Fas-associated death domain”). Essas moléculas, por sua vez, possuem a capacidade de recrutar formas inativas de caspase-8. Várias moléculas denominadas de pro-caspase-8 aproximam-se do local, transformando-se, através de clivagem proteolítica, em moléculas caspase-8 ativas, as quais irão, por sua vez, ativar as caspases executoras responsáveis por dar continuidade ao processo apoptótico (Figura 3) (Callus & Vaux, 2007; Debatin & Krammer, 2004).

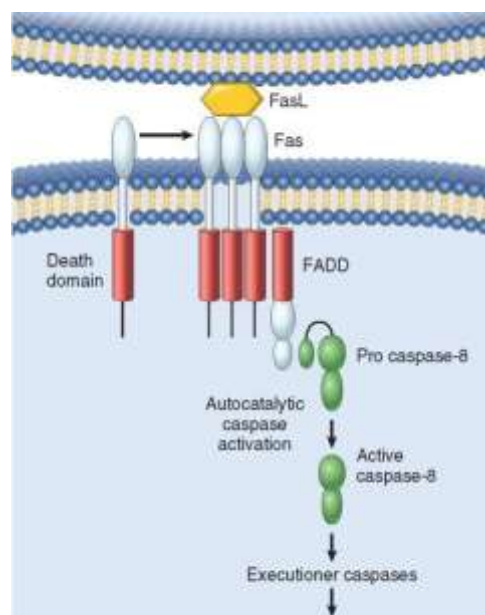


Figura 3. Via extrínseca de ativação da apoptose (recetores de morte)
(Adaptado de Kumar *et al.*, 2010).

A caspase 8 ativa, para além de ativar as caspases executoras possui a capacidade de clivar a proteína pró-apoptótica Bid, presente no citosol, gerando um fragmento truncado dessa proteína, que se liga à mitocôndria, permeabilizando as suas membranas (Parolin & Reason, 2001).

2.2.1.2.2. VIA INTRÍNSECA (MITOCONDRIAL)

A apoptose pode também ser iniciada por sinais de stress intra ou extracelular que resultem em disfunção mitocondrial, tais como danos no DNA, privação de fatores de crescimento, hipóxia, perda de adesão, entre outros (Green & Kroemer, 2004).

A via mitocondrial constitui o principal mecanismo de apoptose em todas as células de mamíferos e o seu papel encontra-se bem estabelecido numa grande variedade de processos fisiológicos e patológicos. Esta via de apoptose surge como resultado da alteração da permeabilidade mitocondrial e libertação de moléculas pró-apoptóticas (indutores da morte) para o citoplasma (Figura 4). Como elemento chave para este estímulo apoptótico encontra-se a libertação do citocromo c, presente no espaço mitocondrial intermembranário, para o citosol (Danial & Korsmeyer, 2004).

As mitocôndrias são organelas importantes, na medida em que participam da manutenção de funções celulares vitais, tais como a respiração celular e a síntese de ATP, modulação do estado redox da célula, regulação osmótica, controlo de pH, homeostasia do cálcio no citoplasma e sinalização intracelular. Paradoxalmente, a mitocôndria contém no espaço intermembranário proteínas letais, capazes de desencadear o processo de morte celular, entre as quais figura o citocromo c. A libertação destas proteínas mitocondriais é controlada por um balanço orquestrado entre membros pró e anti-apoptóticos (Parolin & Reason, 2001; Cory & Adams, 2002). O equilíbrio de ações entre os elementos pró-apoptóticos (ex. Bax, Bak, Bad, Bid, Bcl-Xs, Bag, Bik e Hrk) e anti-apoptóticos (ex. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, Brag-1 e A1) da família Bcl-2 irá determinar a sentença da célula. Existem mais de 20 membros da família Bcl e a maior parte deles funcionam de modo a regular a apoptose. Fatores de crescimento e outros sinais de sobrevivência estimulam a produção de proteínas anti-apoptóticas, sendo as principais Bcl-2, Bcl-x. Estas proteínas encontram-se normalmente no citoplasma e nas membranas mitocondriais, onde controlam a permeabilidade mitocondrial e previnem a fuga de proteínas mitocondriais que possuem a capacidade para desencadear a morte celular (Figura 4A) (Riedl & Salvesen, 2007).

Para a manutenção da integridade celular, é necessário que os componentes pró-apoptóticos, presentes no interior da mitocôndria, não sejam

libertados para o citoplasma. Contudo, quando as células são privadas de sinais de sobrevivência ou o seu DNA se encontra danificado, sensores de stress são ativados. Estes sensores constituem também membros da família Bcl, denominados “BH3 only proteins” que, por sua vez, irão ativar dois efetores críticos (pró-apoptóticos), respetivamente Bax e Bak, os quais formam oligómeros que se inserem na membrana mitocondrial, criando canais que permitirão a passagem de proteínas da membrana mitocondrial interna para o citoplasma. O resultado da ativação Bax-Bak, juntamente com a perda das funções de proteção dos membros anti-apoptóticos da família Bcl, traduz-se na libertação, para o citoplasma, de várias proteínas mitocondriais capazes de desencadear a cascata de caspases (Figura 4B) (Riedl & Salvesen, 2007).

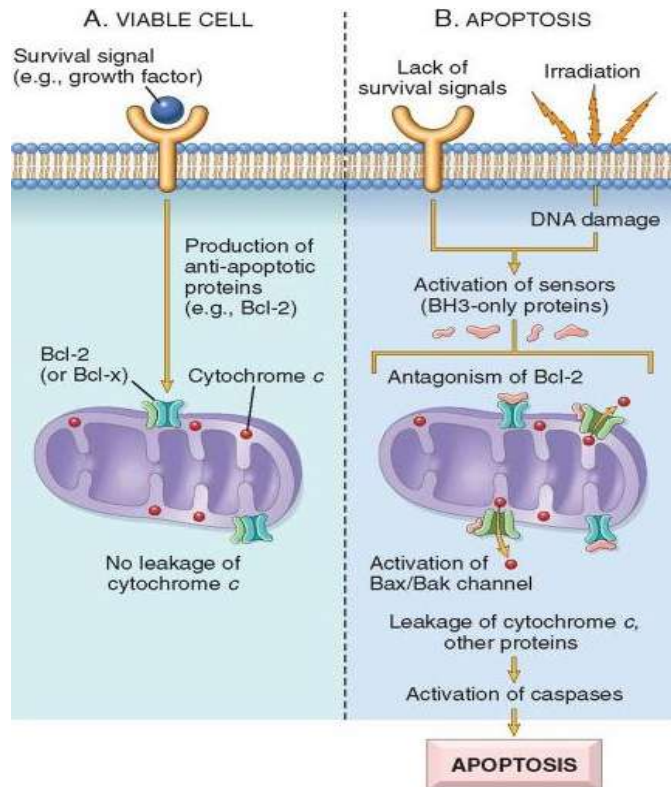


Figura 4. Via intrínseca de ativação da apoptose (mitocondrial)

A) a viabilidade celular é mantida pela indução de proteínas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2, por intermédio de sinais de sobrevivência. Estas proteínas permitem manter a integridade da membrana mitocondrial, evitando fuga de proteínas mitocondriais. B) a perda de sinais de sobrevivência, danos no DNA e outros fatores de stress ativam sensores que antagonizam as proteínas anti-apoptóticas, ativando proteínas pró-apoptóticas, tais como Bax e Bak, as quais formam canais na membrana mitocondrial. A libertação subsequente do citocromo c (e de outras proteínas) origina a ativação das caspases e a apoptose. (Adaptado de Kumar *et al.*, 2010).

Uma das proteínas libertadas é o citocromo c, muito conhecido pelo papel que desempenha ao nível da respiração mitocondrial. Uma vez libertado no citosol, o citocromo c liga-se a uma proteína denominada Apaf-1 (“apoptosis-activating factor-1”) e à pro-caspase 9, formando um complexo designado por apoptossomo. Este complexo promove a clivagem da pró-caspase-9, libertando a caspase-9 ativa que, por sua vez, ativará uma protease executora por excelência, a caspase-3, desencadeando a apoptose (Vaux & Silke, 2003; Shiozaki & Shi, 2004). Além disso, uma supra-regulação da indução da síntese do óxido de azoto (iNOS) foi também relacionada com um aumento da permeabilidade mitocondrial e a libertação do citocromo c (Kim *et al.*, 2002; Atre *et al.*, 2006).

Existem algumas evidências de que a via intrínseca da apoptose pode ser desencadeada sem intervenção das mitocôndrias. A apoptose pode ser iniciada por ativação das caspases a montante da mitocôndria e o subsequente aumento da permeabilidade mitocondrial e a libertação de moléculas pró-apoptóticas servem para amplificar o sinal de morte. No entanto, os mecanismos de apoptose independentes de mitocôndrias não se encontram ainda bem definidos (Joza *et al.*, 2002).

Tanto a via intrínseca como a via extrínseca da apoptose convergem na ativação da caspase-3, dando continuidade a uma via comum de morte celular (Mitchell & Cotran, 2007).

2.3. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA APOPTOSE

Uma vez que a apoptose ocorre através de uma cascata muito bem regulada de eventos, existem muitas possibilidades para medir a atividade destes reguladores ou as consequências funcionais da sua ação. Um grande número de ensaios para detecção e contagem de células apoptóticas tem vindo a ser desenvolvido, no entanto, todos eles apresentam as suas vantagens e desvantagens (Figura 5). Por exemplo, determinadas características da apoptose podem surgir apenas transitoriamente, enquanto outras podem sobrepôr-se parcialmente com a necrose. É por isso importante efetuar dois ou mais ensaios distintos para confirmar que a morte celular está de facto a ocorrer pelo processo de apoptose. Mais ainda, alguns métodos podem ser mais adequados para culturas celulares mas inapropriados para

detetar apoptose em secções de tecidos. Por este motivo, a escolha dos métodos de detecção de apoptose em células, tecidos ou órgãos deve ser sempre bem estudada, avaliando-se de forma prévia as vantagens e os inconvenientes associados a cada método (Watanabe *et al.*, 2003; Otsuki *et al.*, 2003).

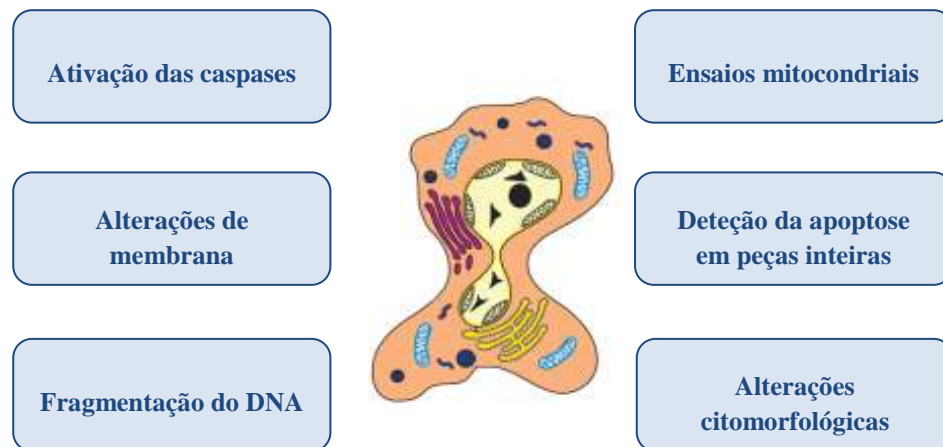


Figura 5. Métodos para detecção da apoptose

A apoptose pode incluir ativação das caspases, fragmentação do DNA, assim como alterações na membrana plasmática e nas mitocôndrias, alterações citomorfológicas, entre outras, podendo ser avaliada por vários métodos em culturas celulares ou biópsias tecidulares (Adaptado de Schulze-Osthoff, 2008).

2.3.1. ATIVAÇÃO DAS CASPASES

Quando as caspases são ativadas, clivam substratos específicos, tornando-os ativos ou inativos. Estas clivagens produzem alterações morfológicas associadas ao processo apoptótico (Taylor *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2003). Existem anticorpos contra uma grande variedade de substratos de caspases, tais como PARP-1 e muitos outros, sendo que várias empresas têm vindo a desenvolver anticorpos que detetam exclusivamente a forma clivada da caspase mas não a forma nativa de um substrato proteico. Estes anticorpos específicos para identificação de um determinado local de clivagem de caspases, como por exemplo os anticorpos desenvolvidos para interagir com a citoqueratina 18 (M30 CytoDEATH), são particularmente úteis para detecção de estados iniciais de apoptose em ensaios celulares e mesmo em biópsias tecidulares através de técnicas imunohistoquímicas (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004).

2.3.1.1. CITOQUERATINA, CITOESQUELETO E APOPTOSE

O citoesqueleto celular é suportado por uma rede de sustentação formada por filamentos e túbulos de reduzidas dimensões. É composto principalmente por elementos estruturais de três tipos: microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários, assim como à membrana plasmática e às membranas das organelas celulares (Young & Heath, 2001).

Os filamentos intermediários (IF) são constituídos por membros de uma família de proteínas, designadas por queratinas, as quais se organizam de modo a formar filamentos de 10-nm, podendo ser subdivididas em tipo I e II. As queratinas possuem um domínio central α -hélice (“central α helical rod domain”), ladeado por dois domínios não hélicos, NH₂- terminal (“head”) e COOH-terminal (“tail”), estes últimos contendo os locais sujeitos a muitas das modificações pós-translacionais, inclusivamente fosforilação (Omary *et al.*, 1998). As citoqueratinas 8 (K8) e 18 (K18) integram os principais constituintes dos filamentos intermediários das células epiteliais, estando ambas sujeitas ao processo de fosforilação. Vários estudos demonstraram que, durante a apoptose, os filamentos K18 sofrem reorganização em estruturas granulares, sendo que esta se encontra associada à fosforilação da citoqueratina 18 em serina 53. Para além disso, foi demonstrado que a citoqueratina 18, mas não a citoqueratina 8, sofre clivagem pelas caspases na região “Linker” L1-2 do domínio central α -hélice (Figura 6).

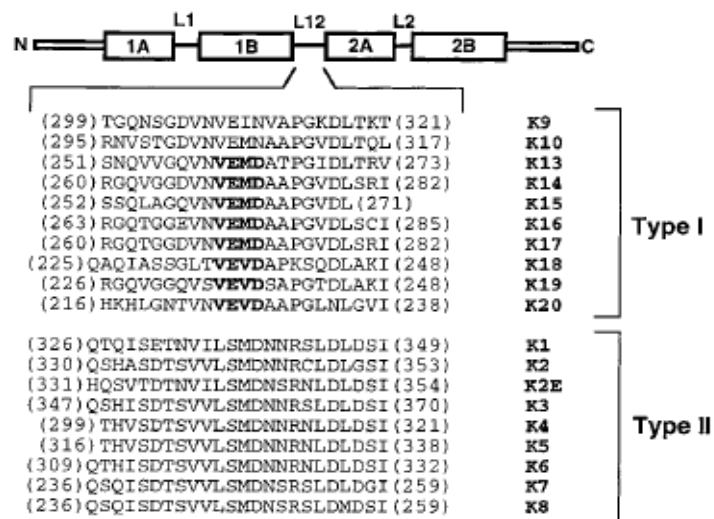


Figura 6. Sequência de aminoácidos da região Linker 1-2 do domínio central dos diferentes membros da família IF. Os potenciais locais de clivagem pelas caspases encontram-se assinalados a negrito (Adaptado de Caulín *et al.*, 1997).

As caspases, ativadas durante a apoptose, clivam a citoqueratina 18 na sua sequência VEVD/A, localizada entre os dois domínios não hélicos. Outro local de clivagem da caspase é o domínio COOH terminal da K18 (Caulín *et al.*, 1997). As caspases -6, -3 e -7 são as principais responsáveis pela clivagem da citoqueratina 18, determinando o aparecimento de um neoepítipo (ausente em células necróticas) que é especificamente reconhecido pelo anticorpo monoclonal *M30 CytoDeath*, tendo este vindo a ser sugerido como um marcador da apoptose, validado *in vitro* (Leers *et al.*, 1999) mas também *in vivo* nos trofoblastos da placenta humana (Austgulen *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 2001), endométrio (Morsi *et al.*, 2000), cólon (Backus *et al.*, 2002; Carr, 2000) e glândulas salivares (Kusama *et al.*, 2000).

Em conclusão, o anticorpo M30 define um epítipo na CK18 que é independente dos eventos de fosforilação das citoqueratinas, permitindo a deteção de fases iniciais de apoptose, antecedendo os ensaios da anexina V ou a positividade dos métodos de deteção da fragmentação do DNA (TUNEL). A reatividade do epítipo em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina torna o M30 uma ferramenta adicional na rotina patológica no que se refere ao impacto da apoptose, tanto retrospectiva como prospetivamente. Uma vez que a exposição do neoepítipo de M30 parece ocorrer numa fase inicial da cascada apoptótica, pode tornar-se vantajoso no estudo da dinâmica deste processo, através da monitorização de procedimentos de indução ou inibição da apoptose, permitindo inclusivamente a quantificação de células epiteliais apoptóticas ao nível do citoesqueleto. A definição do local do epítipo mostra uma correlação com propriedades moleculares conhecidas dos locais de clivagem das caspases. Este facto fornece uma base molecular para um evento apoptótico inicial, oferecendo a possibilidade de intervenção terapêutica quando os processos apoptóticos estão fora de equilíbrio (Leers *et al.*, 1999).

2.3.2. ALTERAÇÕES DE MEMBRANA

Outra característica específica da apoptose é a exposição da fosfatidilserina (PS) para o exterior da membrana plasmática das células apoptóticas. A fosfatidilserina encontra-se normalmente confinada no interior da membrana plasmática de células saudáveis, no entanto, pode ser translocada para o folheto

exterior da membrana como resposta a estímulos pró-apoptóticos. Este mecanismo é dependente da ação das caspases, contudo, o processo pelo qual as caspases promovem a externalização da PS continua por desvendar. A externalização da fosfatidilserina é importante na eliminação de células apoptóticas pois representa um sinal para o envolvimento por macrófagos após ligação a um recetor putativo. Este processo garante a captação precoce de células apoptóticas sem que ocorra libertação dos componentes celulares e sem provocar uma resposta inflamatória (Lauber *et al.*, 2004).

Experimentalmente, a externalização da fosfatidilserina é detetada via Anexina-V, uma proteína que se liga à PS. Podem ser encontrados vários derivados de Anexina-V, associados a diferentes fluorocromos, fornecendo múltiplas possibilidades para medição da apoptose, por exemplo através de citometria de fluxo multicolor ou microscopia de fluorescência. As vantagens incluem a sensibilidade (podem detetar uma única célula apoptótica), a capacidade para confirmar a atividade das caspases iniciadoras, assim como a rapidez do processo. A desvantagem verifica-se ao nível das células necróticas, as quais são também marcadas após rutura da sua membrana plasmática. Desta forma, um controlo crítico consiste na demonstração da integridade da membrana das células PS positivas. Uma vez que a perda de integridade da membrana é uma característica patognomónica do processo necrótico de morte celular, as células necróticas irão corar através de corantes nucleicos ácidos membrano-impermeáveis, tais como iodeto de propídio ou azul tripano. Do mesmo modo, a integridade da membrana das células apoptóticas pode ser demonstrada pela ausência desta marcação. Nestes ensaios, as células viáveis são negativas para a Anexina-V e para o iodeto de propídio, enquanto que as células em fases iniciais de apoptose se apresentam positivas à Anexina-V mas negativas à coloração de iodeto de propídio, sendo que as células necróticas demonstram positividade tanto à Anexina-V como ao iodeto de propídio. A transferência da fosfatidilserina para o exterior da membrana celular permite igualmente o transporte de determinados corantes para o interior da célula de uma forma unidirecional. À medida que a célula acumula o corante e encolhe em volume, o conteúdo celular de corante torna-se mais concentrado, podendo ser visualizado através de microscopia de luz. Este bioensaio de captação de corante

funciona bem em culturas celulares e apresenta um elevado grau de sensibilidade (Elmore, 2007).

2.3.3. FRAGMENTAÇÃO DO DNA

A técnica “DNA laddering” é usada para visualizar os produtos resultantes da clivagem endonucleossómica pelo processo de apoptose. Este ensaio envolve a extração de DNA de uma célula lisada, seguida por eletroforese em gel de agarose. Este processo resulta numa “escada de DNA” característica, em que cada banda da escada se encontra separada por uma sequência de 180 pares de bases de tamanho. Esta metodologia torna-se fácil de executar, possui uma sensibilidade de 1×10^6 células (isto é, o nível de deteção é de cerca de 1.000.000 células), mostrando-se útil para tecidos e culturas celulares com um elevado número de células apoptóticas por massa de tecido ou de volume, respetivamente. Por outro lado, não é recomendada em casos que apresentem baixo número de células apoptóticas. Existem no entanto outras desvantagens neste ensaio. Uma vez que a fragmentação do DNA ocorre numa fase posterior da apoptose, a ausência de uma escada de DNA não elimina o potencial de que as células possam estar a sofrer apoptose precoce (Elmore, 2007).

A apoptose tem sido commumente identificada em tecidos através da aplicação do método TUNEL (“Terminal Dntp Nick End-Labeling”). Este método é utilizado para medição da fragmentação do DNA, baseando-se na avaliação dos produtos endonucleossómicos resultantes da clivagem do DNA (Kressel & Groscurth, 1994). A marcação enzimática, através da enzima deoxinucleotidil transferase terminal (TdT), cataliza a rotulagem das quebras de DNA por intermédio de derivados de UTP (deoxiuridina trifosfato) (Figura 7B), os quais, associados a uma variedade de sondas, permitem a sua deteção por microscopia de luz (técnicas de imunoperoxidase), microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo (Alison, 1999; Cuello-Carrion & Ciocca, 1999; Jerome *et al.*, 2000).

É uma técnica rápida, podendo ser concluída no espaço de algumas horas, no entanto, apresenta desvantagens associadas ao seu elevado custo e ao desconhecimento de quantas quebras de ligação do DNA são necessárias para deteção por este método. Este ensaio encontra-se também sujeito ao aparecimento

de falsos positivos derivados de células necróticas e células em processo de reparação de DNA, sendo que, por estas razões, deverá ser acompanhado por outro ensaio de detecção de apoptose (Elmore, 2007).

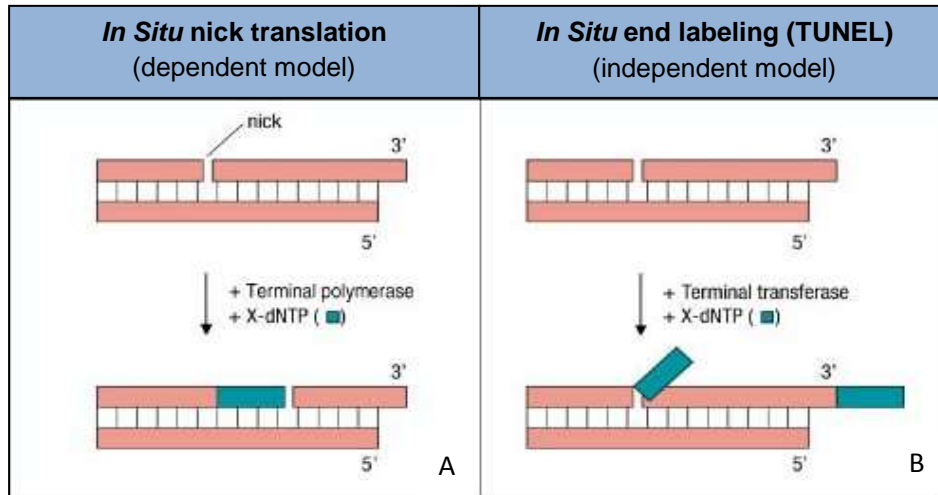


Figura 7. Princípio do método de fragmentação de DNA – TUNEL. Durante a apoptose, a atividade da DNase não gera apenas cadeias duplas e fragmentos de DNA de baixo peso molecular (mono e oligonucleosomos), mas também introduz quebras no DNA de elevado peso molecular. Estes processos podem ser identificados por marcação dos grupos terminais 3'-OH com nucleótidos modificados, através de reações enzimáticas. Existem 2 diferentes métodos: A) utiliza a polimerase terminal para incorporar nucleótidos marcados em locais de quebra de DNA, enquanto que o segundo método B) utiliza a transferase terminal (TdT) para acoplar nucleótidos a todos os grupos terminais OH (Adaptado de Anónimo s/d)

Vários kits encontram-se comercialmente disponíveis para deteção pelo método TUNEL, no entanto, vários investigadores relatam a incidência de elevada coloração de fundo, assim como elevada marcação de falsos-positivos, tornando difícil a interpretação de resultados (Labat-Moleur *et al.*, 1998; Willingham, 1999; Cuello-Carrion & Ciocca, 1999; Jerome *et al.*, 2000). Esta alta taxa de falsos positivos pode potencialmente surgir a partir de vários fatores. Em primeiro lugar, há a considerar as situações de fixação muito extensa de cortes de tecido ou fixação incompleta ou retardada, podendo levar a coloração inespecífica. Em segundo lugar, a necessidade de desmascaramento após o processo de fixação em formol e inclusão em parafina (através de tratamentos proteolíticos), pode produzir ruturas artificiais no DNA, tornando incapaz a diferenciação imunohistoquímica do

verdadeiro processo de apoptose. Finalmente, a necrose também resulta em quebras no DNA e, como tal, representa um alvo para a enzima TdT (Grasl-Kraupp *et al.*, 1995; Cummings *et al.*, 1997; Labat-Moleur *et al.*, 1998; Cuello-Carrion & Ciocca, 1999). Por todas estas razões, muitos investigadores têm sugerido que a interpretação correta dos resultados TUNEL requer a aplicação de um segundo ensaio de detecção para confirmação da apoptose (Collins *et al.*, 1992; Grasl-Kraupp *et al.*, 1995; Elmore, 2007).

2.3.4. ENSAIOS MITOCONDRIAIS

Durante o processo de apoptose, as alterações verificadas ao nível da mitocôndria são mais difíceis de detetar, no entanto, os ensaios mitocondriais e a libertação do citocromo c permitem a detecção em fases iniciais da via intrínseca da apoptose (Bedner *et al.*, 1999; Darzynkiewicz *et al.*, 1999).

A via mitocondrial inicia-se com a permeabilização da membrana mitocondrial externa por inativação dos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, resultando na libertação do citocromo c e outras proteínas do espaço intermembranário para o citosol. O citocromo c é uma hemoproteína que atua como transportadora de eletrões na cadeia respiratória de todos os organismos aeróbios, encontrando-se localizada no espaço mitocondrial intermembranário. Estudos recentes têm identificado o citocromo c citosólico como um fator necessário para ativação da apoptose. Durante este processo, o citocromo c é translocado a partir da membrana mitocondrial para o citoplasma, onde se torna necessário para ativação da caspase-3. A libertação destas proteínas pode ser determinada por imunohistoquímica ou por Western blotting das frações citosólicas, mitocondriais e nucleares (Kroemer *et al.*, 2007).

Também a microscopia de varrimento a laser confocal permite criar fatias óticas submicrométricas através de células vivas, as quais podem ser utilizadas na monitorização de vários eventos mitocondriais em células individuais intactas ao longo do tempo (Bedner *et al.*, 1999; Darzynkiewicz *et al.*, 1999). A alteração da permeabilidade mitocondrial, a despolarização da membrana mitocondrial interna, os fluxos de Ca^{2+} , o estado redox mitocondrial e as espécies reativas de oxigénio podem ser avaliadas segundo esta metodologia. A grande desvantagem deste

método relaciona-se com o facto dos parâmetros mitocondriais monitorizados poderem também ocorrer durante o processo de necrose (Poot & Pierce, 1999).

Outro evento igualmente observado durante o processo de morte celular é a perda do potencial transmembranário interno da mitocôndria, ou seja, o gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia respiratória. Este processo é designado por transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), caracterizando-se pela abertura de um poro proteico não seletivo na membrana mitocondrial interna, o qual é induzido por fluxos de Ca^{2+} , contribuindo para a libertação do citocromo c (Kroemer *et al.*, 2007). O colapso do gradiente eletroquímico pode ser facilmente avaliado através de uma variedade de corantes catiónicos associados a técnicas de citometria de fluxo ou de microscopia de fluorescência (Poot & Pierce, 1999). Em células saudáveis, estes corantes lipofílicos acumulam-se na mitocôndria, formando agregados que emitem uma fluorescência específica. Em células apoptóticas, a membrana mitocondrial externa não mantém o gradiente eletroquímico e o corante catiónico difunde-se para o citoplasma, onde emite uma fluorescência diferente da forma agregada (Elmore, 2007).

Outros corantes mitocondriais podem ser usados para avaliar o potencial redox ou a atividade mitocondrial das células, contudo, estes corantes não consideram o mecanismo de morte celular, devendo sempre ser utilizados em conjugação com outros métodos de detecção da apoptose, nomeadamente ensaios de avaliação de caspases (Elmore, 2007).

A libertação do citocromo c da mitocôndria pode também ser avaliada através de microscopia eletrónica e de fluorescência em células vivas ou fixadas (Scorrano *et al.*, 2002). No entanto, após a sua libertação para o citosol, o citocromo c torna-se uma proteína instável (Goldstein *et al.*, 2000). Deste modo, um controlo não-apoptótico deve ser usado por forma a garantir que as condições de coloração utilizadas são capazes de detetar qualquer citocromo c que se encontre disponível (Elmore, 2007).

Reguladores proteicos apoptóticos ou anti-apoptóticos tais como Bax, Bid e Bcl-2 podem também ser detetados por intermédio da microscopia confocal e de fluorescência (Tsien, 1998; Zhang *et al.*, 2002).

2.3.5. DETEÇÃO EM PEÇAS INTEIRAS

A apoptose pode também ser visualizada em peças integrais de embriões, utilizando determinados corantes tais como Laranja de acridina, Sulfato Azul de Nilo e Vermelho neutro (Zucker *et al.*, 2000). Uma vez que estes corantes são acidófilos, concentram-se em áreas de elevada atividade lisossômica e fagocítica. Os resultados obtidos com estes métodos terão de ser validados em conjugação com outros ensaios apoptóticos, pois estes corantes não permitem a distinção entre detritos lisossômicos apoptóticos degradados e a degradação de outros detritos tais como microorganismos. Ainda que todos estes métodos sejam considerados rápidos e pouco dispendiosos, apresentam certas desvantagens. Por exemplo, o Laranja de acridina é um corante tóxico e mutagénico, extinguindo-se rapidamente sob condições normais, enquanto que o Sulfato Azul de Nilo e o Vermelho neutro não conseguem penetrar tecidos mais grossos, podendo perder-se durante o processamento. O Lysotracker red é outro corante que atua de forma similar, podendo ser usado em microscopia confocal de laser, de forma a proporcionar uma imagem tridimensional de células apoptóticas. Este corante mantém-se estável durante o processamento, consegue penetrar em tecidos mais espessos, não se extinguindo facilmente e pode ser utilizado em culturas celulares assim como em peças de embriões, tecidos e órgãos (Elmore, 2007).

2.3.6. ALTERAÇÕES CITOMORFOLÓGICAS

A avaliação microscópica de secções de tecidos coradas através da hematoxilina-eosina permite a visualização de células apoptóticas. Embora este método permita a deteção de uma única célula apoptótica, torna-se necessária a confirmação através de métodos adicionais. Uma vez que os eventos morfológicos da apoptose ocorrem de forma rápida e os fragmentos são rapidamente fagocitados, pode ocorrer apoptose em determinados tecidos mesmo antes desta ser histologicamente visível. Além disso, este método deteta os eventos mais tardios da apoptose, pelo que células em estádios mais precoces de apoptose não são detetáveis (Elmore, 2007).

Secções ultrafinas obtidas a partir de blocos embebidos em resinas sintéticas podem ser coradas através do Azul de Toluidina ou do Azul de Metileno, de forma a revelar intensamente células apoptóticas coradas, quando submetidas a microscopia de luz. Esta metodologia depende da condensação nuclear e citoplasmática que ocorre durante a apoptose. A preservação de detalhes tecidulares e celulares e a possibilidade de avaliar grandes porções de tecido constituem vantagens distintas deste método. No entanto, pequenos corpos apoptóticos não serão detetados e células saudáveis com elevada densidade de grânulos intracelulares podem ser confundidas com células apoptóticas ou com detritos. Além disso, ocorre uma perda de antigenicidade durante o processamento, facto que impede a execução de técnicas imunohistológicas ou enzimáticas no mesmo tecido, contudo, este tecido pode ser utilizado em microscopia eletrónica de transmissão (Elmore, 2007).

A microscopia eletrónica de transmissão é considerada a fórmula de ouro para confirmação da apoptose. Isto porque a categorização de uma célula apoptótica é irrefutável se a célula apresentar determinadas características morfológicas e estruturais (White & Cinti, 2004). Estas características incluem: 1) núcleos eletrodensos (marginalização na fase inicial); 2) fragmentação nuclear; 3) membrana celular intacta mesmo no final da fase de desintegração celular; 4) desorganização das organelas citoplasmáticas; 5) grandes vacuolos claros; e 6) projeções na superfície celular. À medida que a apoptose progride, estas células irão perder as adesões celulares que mantinham entre si, separando-se das células vizinhas. Durante a fase tardia da apoptose, a célula fragmentar-se-á em pequenos corpos apoptóticos com membranas celulares intactas, contendo organelas citoplasmáticas com ou sem fragmentos nucleares. A fagocitose destes corpos apoptóticos pode também ser visualizada através da microscopia eletrónica de transmissão. As grandes desvantagens deste método são o seu elevado custo, grande dispêndio de tempo e a possibilidade de avaliar apenas, num determinado momento, uma pequena região. Outras desvantagens incluem a dificuldade de detecção de células apoptóticas devido à sua natureza transiente e a incapacidade de detecção de células apoptóticas em estádios iniciais (Elmore, 2007).

3. ASPECTOS TÉCNICOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA

Desde a sua introdução, na década de 40, que os métodos imunohistoquímicos se desenvolveram de forma notável, constituindo atualmente uma ferramenta importante em muitos laboratórios veterinários, sendo amplamente utilizados como uma técnica complementar de diagnóstico (ex. elucidação de diagnósticos diferenciais que não são determináveis pela técnica convencional de hematoxilina-eosina) ou para fins de investigação científica (Brandtzaeg, 1998; Ramos-Vara, 2005).

As bases da imunohistoquímica (IHQ) suportam três grandes doutrinas científicas interligadas entre si: imunologia, histologia e química. O principal conceito que sustenta a IHQ é a detecção de constituintes tecidulares (antígenos - Ag), recorrendo ao uso de anticorpos específicos (Ac). Assim que ocorre uma ligação antígeno-anticorpo (Ag-Ac), esta pode ser demonstrada através de uma reação histoquímica colorimétrica visível por microscopia de luz ou através de fluorocromos em observação de microscopia de fluorescência sob luz ultra-violeta (Brandtzaeg, 1998; Ramos-Vara, 2005; Matos *et al.*, 2010).

Inicialmente, métodos simples e diretos produziam resultados rápidos, contudo demonstrando uma baixa sensibilidade. Atualmente, existem métodos extremamente sensíveis, capazes de detetar simultaneamente um ou vários antígenos. Outros avanços significativos recentes englobam técnicas de recuperação antigénica que permitem, através do calor, minimizar os efeitos deletérios da fixação, aumentando significativamente o número de antígenos detetáveis em tecidos fixados (Ramos-Vara, 2005).

3.1. BREVE RESUMO HISTÓRICO

A história da imunohistoquímica teve início quando Marrack conseguiu produzir reagentes contra os microorganismos do tifo e da cólera, usando uma marcação vermelha conjugada com um tetaedro de benzidina (Marrack, 1934; Matos *et al.*, 2010). No entanto, o Professor Albert H. Coons acreditava que, em tecidos, a detecção antigénica fornecida pela cor vermelha possuía reduzida sensibilidade em microscopia óptica pelo que, na década de 40, veio a demonstrar que a localização

de antígenos, particularmente microorganismos, era possível em amostras de tecidos usando anticorpos contra *Streptococcus pneumoniae* marcados com fluoresceína, observados através de luz ultra-violeta (microscopia de fluorescência) (Coons *et al.*, 1941).

Subsequentemente, a introdução de enzimas como anticorpos marcados, desenvolvida por Nakane, anunciava uma nova e importante era para a imunohistoquímica, uma vez que tornava possível a observação destas reações através da microscopia ótica, tendo estes resultados gerado um grande impacto na década de 60 (Avrameas & Uriel, 1966; Nakane, 1968).

As descobertas seguintes, nomeadamente do método peroxidase-antiperoxidase (PAP) por Sterberger *et al* (Sterberger *et al.*, 1970) e do método alcalina fosfatase-antialcalina fosfatase (APAAP) por Mason *et al* (Mason & Sammons, 1978a,b), aumentaram de forma significativa a aplicação da técnica de imunohistoquímica (Sterberger *et al.*, 1970; Cordell *et al.*, 1984). Foi também durante este período que foi introduzida a molécula diaminobezidina (DAB) conjugada a anticorpos, representando atualmente o cromogénio mais utilizado para reações de peroxidase (Sterberger, 1967).

As descobertas de Huang *et al* (1976), nomeadamente no que diz respeito aos métodos de recuperação antigénica (exposição de epítomos antigénicos presentes nos tecidos em estudo, favorecendo as reações antígeno-anticorpo), associadas aos sistemas de deteção secundária de anticorpos (como por exemplo o complexo avidina-biotina-peroxidase – ABC e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase – LSAB) introduzidos por Hsu *et al* (1980), permitiram que as técnicas de imunohistoquímica viessem a ser utilizadas em amostras frescas, assim como em tecidos fixados, incrementando desta forma a aplicabilidade da técnica nos diagnósticos patológicos de rotina. Contudo, só após a presença de antígenos tecidulares ter sido demonstrada pelo método da imunoperoxidase em tecidos fixados em formalina, a imunohistoquímica se integrou de forma efetiva nos diagnósticos de rotina em anatomia patológica (Leong & Wright, 1987; Taylor & Cote, 1994; Rosai, 1996; Swanson, 1997; Bodey, 2002; Werner & Campos, 2005).

Ao longo das últimas décadas tem vindo a ser registado um aumento significativo de publicações científicas baseadas em técnicas de imunohistoquímica e imunocitoquímica, refletindo desta forma a posição que atualmente ocupam nos

laboratórios de anatomia patológica, não só como uma importante ferramenta de investigação científica, mas também por constituírem uma técnica complementar de diagnóstico (Nadji, 1986; Leong & Wright, 1987; Rickert & Maliniak, 1989; Schmitt, 1991; Taylor & Cote, 1994; Torres *et al.*, 1995; Rosai, 1996; Torres, 1998; Weiss & Chang, 1999; Bodey, 2002; Ramos-Vara, 2005).

3.2. APLICAÇÕES E IMPORTÂNCIA

As reações imunohistoquímicas podem ser usadas em diferentes situações, nomeadamente no campo da investigação científica ou em laboratórios de anatomia patológica. As mais importantes aplicações incluem: 1) diagnóstico histogenético de neoplasias morfológicamente não diferenciadas (Figura 8); 2) subtipagem de neoplasias (como o caso dos linfomas, por exemplo); 3) caracterização da localização primária de neoplasias malignas; 4) pesquisa de fatores prognósticos e indicações terapêuticas de determinadas doenças; 5) diferenciação da natureza benigna *versus* maligna de determinadas proliferações celulares (Figura 9), através da identificação de estruturas, organismos e materiais secretados pelas células (Leong & Wright, 1987; Taylor & Cote, 1994; Alves *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 2000; Bodey, 2002; Jaffer & Bleiweiss, 2004).

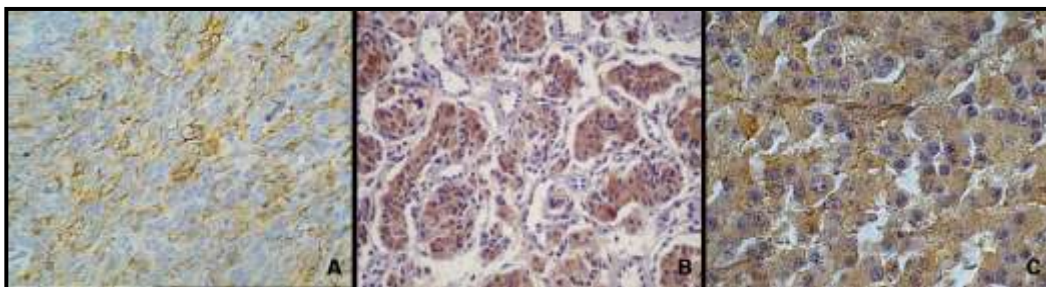


Figura 8. Diagnóstico histogenético de neoplasias usando a técnica de imunohistoquímica. A) Expressão da citoqueratina AE1/AE3 num carcinosarcoma pulmonar (IHQ-peroxidase 200X); B) Expressão da cromogranina num carcinoma neuroendócrino gástrico (IHQ-peroxidase – 100X); C) Reação imunohistoquímica com HMB 45 num melanoma de murino (IHQ-peroxidase – 400X) (Adaptado de Matos *et al.*, 2010).

Werner e seus colaboradores decidiram avaliar o número de casos nos quais a imunohistoquímica auxiliou ao diagnóstico de neoplasias e de lesões

pseudo-neoplásicas. Dos resultados obtidos, concluíram que esta técnica constituiu um método de diagnóstico complementar em cerca de 95% dos casos estudados, contribuindo desta forma para uma conduta cirúrgica e terapêutica, com baixo custo e elevado benefício (Werner e Campos, 2005).

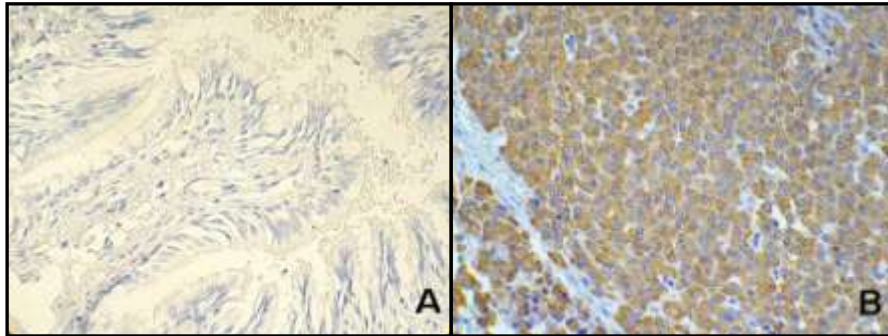


Figura 9. Expressão da heparanase no diagnóstico de tumores carcinóides broncopulmonares. Microscopia ótica a 400X. A) Reação negativa da heparanase (ausência de marcação citoplasmática) na mucosa bronquial; B) Reação positiva da heparanase (áreas castanhas no citoplasma) (Adaptado de Matos *et al.*, 2005).

3.3. LIMITAÇÕES, DIFICULDADES E PROBLEMAS ASSOCIADOS À IMUNOHISTOQUÍMICA

Embora a técnica de imunohistoquímica seja relativamente simples de executar, esta possui algumas particularidades que tornam o seu sucesso dependente de vários fatores. A utilidade e contribuição da imunohistoquímica na resolução de problemas em anatomia patológica é diretamente proporcional à experiência das mãos que executam os procedimentos e à visão que interpreta os resultados (Leong & Wright, 1987; Rosai, 1996; Alves *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 2000; Jaffer & Bleiweiss, 2004; Yaziji & Barry, 2006). Portanto, embora muito simples no conceito, os métodos de imunocoloração exigem rigor de execução, apresentando muitas vezes falhas significativas, razão pela qual a interpretação dos resultados deve ser realizada com extrema cautela (Brandtzaeg, 1998; Matos *et al.*, 2010). Pela aplicação de princípios imunológicos, métodos avidina-biotina e/ou de amplificação enzimática, pode obter-se elevada sensibilidade, contudo, os vários passos da técnica podem ser fonte de interações indesejadas. É desta forma importante planejar antecipadamente toda a execução prática, de modo a evitar

falsos resultados (Brandtzaeg, 1998). Dos vários fatores que podem influenciar um resultado imunohistoquímico, salientam-se os abaixo descritos.

3.3.1. FATORES PRÉ-ANALÍTICOS

Segundo Jambhekar *et al.* (2008), os fatores pré-analíticos capazes de influenciar o resultado final de uma reação imunohistoquímica estão relacionados com a amostra na sua origem. Englobam o tempo decorrido para a excisão do tecido durante a cirurgia, a subsequente isquémia, o intervalo entre a remoção cirúrgica e a fixação, o tipo de fixador e o tempo de fixação, as dimensões do tecido, etc.

A fixação de tecidos em formaldeído e a sua subsequente inclusão em parafina constituem os procedimentos histológicos mais utilizados em todo o mundo. No entanto, ainda que a fixação em formaldeído promova uma excelente preservação da arquitetura dos tecidos, resulta igualmente numa variavelmente reversível perda de imunorreatividade, mascarando os antigénios presentes ou provocando danos nos locais de ligação dos anticorpos (Rickert & Maliniak, 1989; Arnold *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 2000; Ramos-Vara, 2005). Embora alguns epítomos (área da molécula de antigénio que se liga aos recetores celulares e aos anticorpos) possam ser desmascarados por vários métodos de recuperação, o sistema de deteção imunohistoquímico deve ainda possuir a sensibilidade suficiente para originar um sinal de forte amplitude (Wasielwski *et al.*, 1998).

Geralmente, tempos de fixação prolongados ou insuficientes podem afetar a sensibilidade da marcação imunohistoquímica (Werner *et al.*, 2000). Antes da introdução dos métodos de recuperação antigénica, era altamente recomendável a fixação por um curto período de tempo (Fox *et al.*, 1985; Battifora & Kopinski, 1986; Leong & Gilham, 1989). Contudo, atualmente sabemos que a recuperação antigénica mediada pelo calor pode reduzir ou até mesmo eliminar as variações de marcação geradas por períodos de fixação prolongados (Shi *et al.*, 1997). Vários trabalhos têm vindo a ser desenvolvidos com o intuito de demonstrar quais os tempos de fixação ótimos para determinados antigénios. Segundo Munakata & Hendricks (1993), um tempo de fixação de cerca de 4 horas foi considerado ótimo para marcação antigénica do Ki-67, pelo método de recuperação em microondas. Sob condições experimentais por eles desenvolvidas, os autores concluíram ainda

que longos períodos de fixação revelaram ser preferíveis a períodos mais curtos, uma vez que a prolongada fixação não demonstrou efeitos negativos com a utilização de tratamentos em microondas. Lee *et al.* (2002) demonstraram também que, diferentes períodos de fixação (pelo menos durante 24 horas) não revelaram quaisquer efeitos adversos na marcação imunohistoquímica de recetores estrogénicos, sob procedimentos de recuperação antigénica idênticos. Um estudo desenvolvido por Arber (2002), sobre os efeitos da prolongada fixação em formalina na reatividade imunohistoquímica de tecido mamário, mostraram que esta não reduziu de forma significativa a deteção antigénica para o Ki-67, p27 ou vimentina, mesmo quando o tempo de fixação dos tecidos alcançou os 154 dias. Miller *et al.* (2005) mostraram que um período de fixação de 26 dias não afetou de forma negativa a imunorreatividade do vírus da diarreia bovina, enquanto que um período de fixação mais longo (137 dias) deu origem a resultados falso-negativos. Hoetelmans *et al.* (2001) demonstraram que, após um longo período de fixação, a imunorreatividade nuclear do Bcl-2 foi irreversivelmente perdida. Trabalhos desenvolvidos por Webster *et al.* (2009) revelaram ainda que a fixação prolongada em formalina não constitui um fator limitante na deteção antigénica da grande maioria dos anticorpos mais amplamente utilizados em imunohistoquímica, no entanto, alguns demonstraram um moderado a marcado decréscimo nas suas capacidades de deteção após prolongada fixação. Desta forma, concluíram que é provável que os efeitos da fixação prolongada em formalina dependam do anticorpo, do antigénio em estudo e do método de recuperação antigénico escolhido (Webster *et al.*, 2009).

Os aldeídos, tais como o formaldeído e o glutaraldeído, representam os agentes fixadores mais utilizados, contudo, ao contrário do primeiro, o glutaraldeído possui dois grupos funcionais que originam ligações cruzadas muito estáveis e irreversíveis (Eltoum *et al.*, 2001). Num estudo realizado por Hann *et al.* (2001), foi demonstrado que tecidos fixados simultaneamente em paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2% revelaram uma maior densidade de marcação comparativamente a tecidos fixados em menores concentrações de aldeído. Estes autores levantaram a hipótese de que uma maior concentração de fixador pode manter intacta uma maior quantidade de epítomos antigénicos. Além disso, sugeriram que tal fenómeno pode

ser justificado pela presença simultânea dos dois aldeídos, assim como pelas diferentes propriedades químicas de fixação associadas a cada um deles.

3.3.2. FATORES ANALÍTICOS

Os fatores analíticos capazes de influenciar o resultado imunohistoquímico final relacionam-se com a escolha da metodologia/processos a desenvolver. Existe uma grande variedade de protocolos em imunohistoquímica, pelo que a elaboração de um manual standard de procedimentos permitirá minimizar falhas indesejadas, garantindo maior reprodutibilidade e comparabilidade (Jambhekar *et al.*, 2008).

É importante referir que, no processamento de tecidos, a inclusão em parafina (geralmente a temperaturas de 60°C) pode comprometer a antigenicidade de uma reação. Outro ponto de especial importância inclui a preparação dos cortes histológicos. Estes devem apresentar preferencialmente uma espessura entre os 3 e os 7µm, devendo ser colocados em lâminas adesivadas (silane ou polilisina). Cortes com uma espessura inferior a 3µm podem dar origem a fraca imunomarcção, enquanto que espessuras superiores a 7µm podem levar à perda do tecido ou dificultar a análise do resultado final (Yaziji & Barry, 2006).

No que se refere à recuperação antigénica, a simplificação de procedimentos e a redução de custos e erros técnicos constituem fatores de extrema importância (Alves *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1991). A descoberta dos métodos de recuperação antigénica assume grande relevância pois, uma vez que a fixação em formalina mascara os epítomos, este procedimento permite uma maior exposição/acessibilidade dos epítomos antigénicos presentes no tecido em estudo, favorecendo as interações antigénio-anticorpo (Curran & Gregory, 1978). A recuperação antigénica pode ser obtida através de diferentes métodos, sendo que a escolha adequada reflete a dependência de vários fatores, nos quais se incluem o tipo de fixador e o tempo de fixação, a natureza do antigénio e/ou anticorpo, não se encontrando, no entanto, isenta de limitações e inconvenientes, tais como coloração de fundo, falsos positivos ou negativos, desmascaramento da biotina endógena. Embora cada uma das abordagens de recuperação antigénica possa ser útil para desmascarar um determinado epítomo, pode, simultaneamente, tornar-se uma desvantagem (D'Amico *et al.*, 2009).

A introdução de sistemas de detecção (anticorpos secundários) constitui também um fator importante na redução de erros. A reação Ag-Ac não é visível sob microscopia de luz a menos que seja “rotulada”. Desta forma, moléculas marcadoras são associadas a anticorpos primários, secundários ou terciários de um sistema de detecção, de modo a permitir a visualização da reação imunológica. Uma grande variedade de marcadores têm vindo a ser utilizados, incluindo compostos fluorescentes, enzimas e metais (Lucocq & Roth, 1985; Taylor *et al.*, 2002). Os marcadores mais comuns são enzimas (peroxidase, fosfatase alcalina, glucose oxidase). As enzimas, na presença de um substrato específico e de um cromogénio produzem um precipitado colorimétrico no local da reação Ag-Ac (Ramos-Vara, 2005). A seleção de um sistema de detecção adequado constitui uma das grandes responsabilidades enfrentadas num laboratório, uma vez que a sensibilidade de uma reação imunológica irá depender em grande parte do sistema escolhido (Matos *et al.*, 2010).

3.3.3. FATORES PÓS-ANALÍTICOS

A avaliação pós-analítica constitui uma das principais componentes de uma reação imunohistoquímica. A interpretação baseada exclusivamente na atribuição de um resultado positivo ou negativo torna-se inapropriada sem que ocorra uma apreciação conjunta do padrão de coloração (Elias, 1991). Uma reação imunohistoquímica deve ser interpretada não só ao nível das células ou das estruturas nas quais se prevê que ocorra marcação, mas também, em células positivas, deve ser avaliada a manifestação de um padrão correto de coloração (membranoso, citoplasmático, nuclear, ponteadado, difuso, perinuclear). O número de células (percentagem) que demonstram imunorreatividade, bem como a intensidade da marcação perfazem os restantes critérios de avaliação. Todas estas características possuem grande influência na decisão final (Chu *et al.*, 2000).

A manifestação inesperada de imunorreatividade deve ser vista de forma crítica e interpretada com muita atenção. Um resultado falso-positivo pode ocorrer devido à presença de biotina endógena, quer seja em tecidos normais quer em tecidos neoplásicos. Um exame metuculoso dos tecidos especificamente

determinados como controlos negativos tem sido recomendada de forma a evitar uma interpretação errónea (Mount & Cooper, 2001).

Resultados imunohistoquímicos apelidados como reações inespecíficas, reações cruzadas, ou, expressão aberrante de anticorpos, são bem conhecidos e as suas implicações práticas no diagnóstico histopatológico tornam-se significativas (Brown *et al.*, 1987; Swanson, 1991).

O passo final da imunohistoquímica envolve a integração dos resultados na configuração clínica correta. Na ausência de um resultado esperado, há uma tendência para apontar falhas da técnica ou considerar o baixo poder de marcação do anticorpo. Supondo que os fatores pré-analíticos e analíticos foram respeitados, o registo final em caso de um dilema de diagnóstico não se resume apenas tendo por base o resultado imunohistoquímico, mas sim, conjugando todos os dados clínicos disponíveis, os resultados da coloração de rotina H&E e as observações imunohistoquímicas encontradas. Desta forma, um diagnóstico definitivo não pode ser processado se a tentativa de diagnóstico morfológico se apresentar incorreta ou não incluída no diagnóstico diferencial (Rudiger, 2002).

Dos fatores acima citados, capazes de influenciar o resultado final, podem retirar-se importantes considerações no que respeita às limitações da técnica imunohistoquímica. O resultado final obtido encontra-se altamente dependente do manuseamento do espécime de tecido. Para além disso, qualquer seleção da metodologia a desenvolver deve tornar-se necessariamente um compromisso pois, seria bastante irrealista esperar que um procedimento padrão conseguisse, simultaneamente, imobilizar todos os tipos de antígeno, preservar a sua antigenicidade de forma adequada, garantir fácil acesso do anticorpo ao antígeno correspondente e, preservar a integridade estrutural do tecidos e células ao nível da microscopia de luz/eletrónica (Brandtzaeg *et al.*, 1997).

3.4. MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO ANTIGÉNICA

3.4.1. TRATAMENTOS MEDIADOS PELO CALOR

As técnicas de recuperação antigénica mediadas pelo calor, com as suas numerosas modificações, constituem atualmente a abordagem mais utilizada, uma

vez que podem ser aplicadas eficazmente a uma grande quantidade de antigénios previamente sujeitos a fixação em formalina (D'Amico *et al.*, 2009). Estas técnicas englobam a utilização de banho-maria, autoclavagem, radiação por microondas, tratamento em panela de pressão, etc. (Shi *et al.*, 1991; Gown *et al.*, 1993; Leong *et al.*, 1996). As elevadas temperaturas ou, no caso do microondas, o movimento molecular, são os fatores que, aparentemente, mais contribuem para a reversão do efeito adverso de perda de antigenicidade provocada pela fixação em formalina (Portiansky & Gimeno, 1996). Embora a fonte de calor escolhida seja indiferente, o tratamento em microondas representa a fonte de calor mais utilizada (Taylor *et al.*, 1996), no entanto, demonstra alguns inconvenientes tais como a geração de artefactos causados pela evaporação do tampão ou pelo sobreaquecimento local (Norton *et al.*, 1994). Além disso, contrariamente ao autoclave, o tratamento em microondas pode causar danos na morfologia celular (Hunt *et al.*, 1996). De todos os métodos, o tratamento em panela de pressão e a autoclavagem parecem ser mais efetivos do que os tratamentos em microondas, uma vez que permitem alcançar temperaturas mais elevadas e mais uniformes (Chu *et al.*, 2000).

De acordo com os antigénios em estudo, também diferentes soluções de recuperação podem ser utilizadas. Ainda que o tampão citrato represente o meio mais comum, outras soluções tais como a água destilada, EDTA, cloreto de alumínio, sulfato de zinco, ácido fórmico, anidrido citracónico podem ser usadas (Suurmeijer, 1992; Cattoretti *et al.*, 1993; Norton *et al.*, 1994; Pileri *et al.*, 1997; Namimatsu *et al.*, 2005). No entanto, os métodos de recuperação antigénica mediada pelo calor não são necessariamente adequados a todos os antigénios (Jasani & Rhodes, 2001), dado que todos eles possuem as suas limitações e, tanto temperaturas excessivas como reduzidas, podem produzir resultados negativos (Shi *et al.*, 2001). Desta forma, conclui-se que a recuperação antigénica é realmente uma tarefa complexa (Gown, 2004) e cada laboratório deve cuidadosamente afinar este aspeto vital de um protocolo de imunohistoquímica (Jambhekar *et al.*, 2008).

3.4.2. DIGESTÃO ENZIMÁTICA

A digestão enzimática é usada para recuperar epítomos que possam ter perdido a sua antigenicidade com os métodos induzidos pelo calor. Torna-se útil

para um número limitado de antígenos, tais como as citoqueratinas (Jasani & Rhodes, 2001). Infelizmente, o uso da digestão enzimática constitui uma abordagem mais agressiva quando comparada com os métodos mediados por calor pois, se utilizada por um período extensivo, pode destruir alguns epítomos assim como causar danos estruturais na morfologia dos tecidos (Pileri *et al.*, 1997). Uma vez que o grau de imunorreatividade é geralmente proporcional ao tempo de fixação, os tecidos fixados por um período mais longo requerem tratamentos enzimáticos mais prolongados e/ou mais vigorosos (Yamashita, 2007). As secções de tecidos, após desparafinação e rehidratação, são submetidas à ação de enzimas proteolíticas, sob temperaturas de 37°C ou a temperatura ambiente. De forma a limitar a reação enzimática, fatores experimentais tais como a concentração, o tempo e a temperatura devem ser controlados. Subsequentemente, a reação enzimática é bloqueada pela ação de uma solução tampão a 4°C (Shi *et al.*, 1993).

O uso de proteínase K representa uma eficiente abordagem para a recuperação de alguns antígenos (Rojo *et al.*, 2006; Jessie *et al.*, 2004). Outras proteases, tais como a tripsina, quimotripsina, pepsina ou pronase, podem também ser utilizadas para revelar locais antigénicos (Ward *et al.*, 2006).

De uma forma geral, a digestão proteolítica não intensifica de forma significativa uma imunoreação quando comparada com o tratamento pelo calor, no entanto, constitui um método eficaz para antígenos que perderam a sua antigenicidade após exposição ao calor (Yamashita, 2007).

Se o método de recuperação falhar, a combinação entre calor e digestão enzimática pode funcionar como alternativa. Esta abordagem torna-se útil quando se pretende uma marcação dupla (D'Amico *et al.*, 2009).

Merz *et al.* (1993) sugerem uma combinação entre digestão com protease associada a um tratamento em microondas com o intuito de melhorar a coloração citoplasmática e de superfície das imunoglobulinas de cadeias leves e pesadas. No entanto, trabalhos realizados Cuevas *et al.* (1994), nos quais foi utilizado tratamento em microondas e digestão enzimática com tripsina para recuperação antigénica, não demonstraram uma melhor qualidade na marcação comparativamente à utilização única de tratamento em microondas. Por sua vez, Ezaki (2000) sugere uma combinação entre um aquecimento suave em microondas (em 10mM de tampão citrato, pH 6.0 a 80°C, durante 15-20 minutos) e digestão enzimática com pepsina

(0,005% em 10mM HCl, pH 2.0 a 37°C, por 15 minutos), em casos que se pretenda avaliar antigénios nucleares de proliferação celular (PCNA) em tecidos de ratos fixados em formol e embebidos em parafina, assim como para casos de imunocoloração dupla de PCNA em conjunto com α -actina, bromodesoxiuridina, queratina, colagénio tipo IV e vimentina. Uma sugestão semelhante foi dada por Frost et al. (2000) para a imunocoloração de recetores de estrogénio e progesterona em carcinomas mamários, tendo sido utilizada recuperação antigénica conjunta com 10mM tampão citrato a 80°C por 2 horas, seguindo-se tratamento enzimático com tripsina (D'Amico *et al.*, 2009).

3.5. SELEÇÃO DE ANTICORPOS

A seleção do painel de anticorpos constitui igualmente um dos aspetos mais importantes para otimizar a aplicabilidade da imunohistoquímica (Alves *et al.*, 1999). Estudos realizados por Jensen e seus colaboradores demonstraram que a seleção do painel de anticorpos e a interpretação dos padrões de reação associados a cada caso, constituíram os fatores mais importantes para o diagnóstico final (Jensen *et al.*, 1997). Esta observação foi fundamental pois a sensibilidade de detecção do painel escolhido aumenta com o aumento da prática e com a experiência do patologista que indica o método (Yaziji & Barry, 2006).

Os anticorpos primários podem ser divididos em duas categorias: poli ou monoclonais. O grupo dos policlonais inclui aqueles que são obtidos a partir da imunização de diferentes espécies animais (exemplo: coelho, cabra, cavalo, macaco, rato, ovelha, etc) e resultam em anticorpos capazes de reconhecer vários epítomos do mesmo antigénio, gerando uma maior afinidade e uma mais ampla reatividade, contudo com menor especificidade quando comparados com os anticorpos monoclonais (Nadji, 1986; Brandtzaeg, 1998; Hayat, 2002; Lipman & Jackson, 2005).

3.5.1. ANTICORPOS POLICLONAIS

Os anti-soros policlonais incluem não só vários diferentes anticorpos para a proteína alvo, mas podem conter igualmente e, em alta concentração (até 10 mg/ml),

a presença de anticorpos irrelevantes, caso não sejam purificados por afinidade. Os anticorpos policlonais apresentam vantagem sobre os monoclonais na medida em que são mais suscetíveis na identificação de múltiplas isoformas (epítomos) da proteína alvo (Figura 10). No entanto, devido à presença, na mesma preparação policlonal, de anticorpos para epítomos imunogénicos fortes e fracos, esta pode tornar-se muito heterogénea. Variações na titulação e na qualidade dos anticorpos, dependendo do animal imunizado, podem também contribuir para a variância entre os lotes de anticorpos (Nelson *et al.*, 2000). A “promiscuidade imunológica” dos anticorpos policlonais que pode constituir uma vantagem (por exemplo, mais possibilidades de detetar um Ag através da multiplicidade de reconhecimento dos epítomos), pode também tornar-se uma desvantagem, ou seja, quanto maior o número de diferentes anticorpos para a proteína alvo, maior é a possibilidade de reatividade cruzada com epítomos semelhantes de outras proteínas e, por conseguinte, maior a probabilidade de falsos positivos (Mighell *et al.*, 1998).

Quanto melhores forem as técnicas de purificação, tanto melhor será a qualidade do soro policlonal. O uso de animais de laboratório pouco expostos a ambientes adversos (altamente contaminados por antigénio) facilita a obtenção de soros com poucos anticorpos previamente desenvolvidos contra outros antigénios. Os anticorpos são obtidos a partir da imunização dos animais (sendo o mais utilizado o coelho) com antigénios purificados (imunogénicos), usando doses que podem ir dos 10µg aos 200µg (Figura 11).

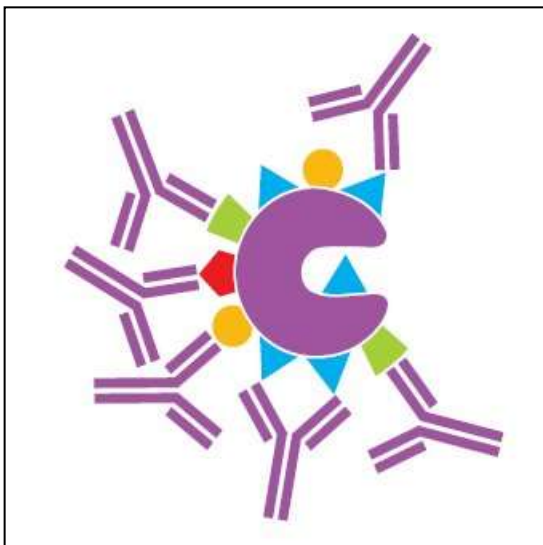


Figura 10. Representação esquemática de anticorpos policlonais ligados a vários epítomos antigénicos (Adaptado de Boenisch, 2009).

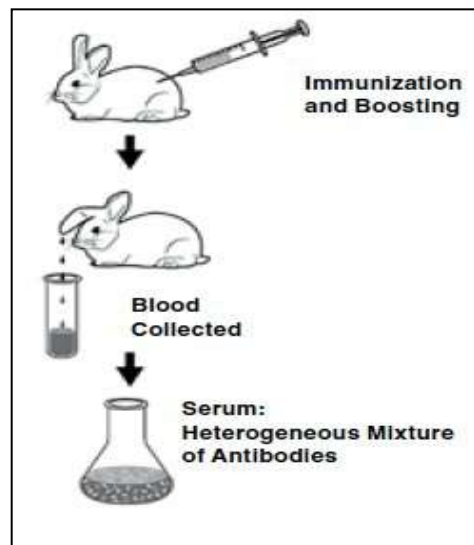


Figura 11. Processo de produção de anticorpos policlonais (Adaptado de Boenisch, 2009)

De um modo geral, a imunização é realizada de forma intradérmica ou subcutânea, podendo também ser administrada na almofada plantar, no músculo ou na cavidade peritoneal. As injeções são repetidas a intervalos regulares de modo a manter alta a concentração de anticorpos específicos. O período de imunização pode variar de 3 a 8 meses e a resposta é produzida sob a forma de anticorpos que reconhecem e se ligam especificamente ao antígeno. O sangue é recolhido a partir da orelha do coelho, veia jugular de grandes animais ou, através do coração após sacrifício do animal. O soro é separado dos elementos celulares do sangue por centrifugação ou outros métodos adequados, podendo ser purificado de forma a permanecerem apenas os anticorpos desejados (Hayat, 2002).

3.5.2. ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos monoclonais são desenvolvidos a partir de híbridos e fornecem anticorpos apenas contra um epítipo antigénico, obtendo-se resultados mais específicos (Figura 12) (Nadji, 1986; Brandtzaeg, 1998; Lipman & Jackson, 2005). Os anticorpos monoclonais são produzidos maioritariamente em ratinhos, os quais são injetados repetidamente com um imunogénio purificado (Ag) (Figura 13). Depois de alcançada uma resposta imunitária, os linfócitos B (células produtoras de anticorpos) são recolhidos a partir do baço. Uma vez que, isoladamente, as células B possuem um período de vida limitado, estas são fundidas com uma linha celular constituída por células de mieloma de ratinho. A célula híbrida produzida (hibridoma) é uma célula imortal que produz imunoglobulinas (Igs) específicas para um único epítipo (anticorpos monoclonais). A este processo segue-se uma seleção de hibridomas de especificidade desejada, ou seja, procede-se à colocação individual das células resultantes da fusão em cultura, de modo a poderem recolher-se os anticorpos por elas produzidos. Posteriormente, são realizados testes para os anticorpos em causa, no sentido de determinar as suas características. Para finalizar, promove-se a manutenção das culturas (clones) que demonstrem características úteis e a destruição das restantes, procedendo-se à recolha sistemática dos anticorpos produzidos pelo clone que passam a constituir o soro monoclonal e que podem ser utilizados em IHQ (Nelson *et al.*, 1991).

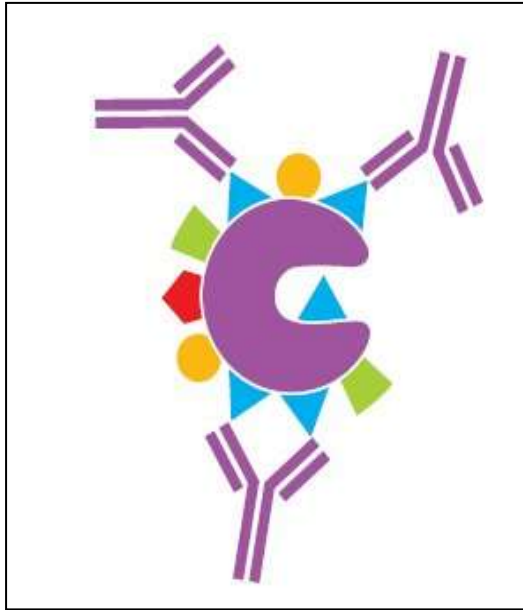


Figura 12. Representação esquemática de um determinado clone de Ac monoclonais reagindo com epítipo específico de um antígeno (Adaptado de Boenisch, 2009).

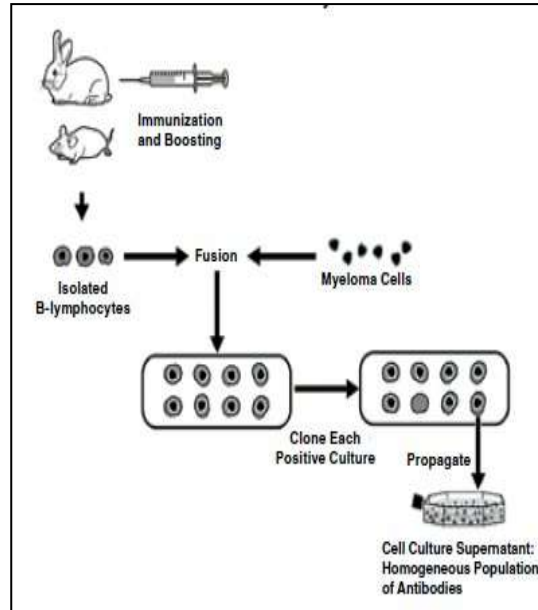


Figura 13. Processo de produção de anticorpos monoclonais (Adaptado de Boenisch, 2009).

A grande vantagem destes anticorpos está associada à sua elevada especificidade quando comparados com os anticorpos policlonais (Quadro 2). Os hibridomas podem ser mantidos em culturas de células (Ac altamente puro mas em baixa concentração) ou no peritoneu de ratinhos (líquido ascítico, que tem uma concentração 10 a 100 vezes mais elevada do que a concentração de Ac em cultura de células, mas possui proteínas inespecíficas e imunoglobulinas endógenas de ratinho). Esta especificidade reduz, embora não remova completamente, a possibilidade de reatividade cruzada com outros antígenos. Uma razão para a ocorrência desta reatividade cruzada está relacionada com o facto dos anticorpos monoclonais serem dirigidos contra epítopos que consistem de um pequeno número de aminoácidos e que podem ser parte constituinte de vários tipos de proteínas e péptidos (Nelson *et al.*, 1991). Por exemplo, um anticorpo proinsulina anti-humano produz uma reação cruzada tanto com as células produtoras de insulina como com as células produtoras de glucagon (Bendayan, 1995). Uma vez que esta ligação ocorre para um epítipo idêntico, as características de coloração são quase ou praticamente idênticas para o epítipo antigénico de destino, tornando muito difícil a sua distinção. A marcação de fundo dos anticorpos monoclonais resultante de

imunoglobulinas (classe de proteínas que demonstram configuração em Y e possuem a capacidade de anticorpo) não específicas é reduzida (fluido ascítico) ou mesmo inexistente (cultura celular sobrenadante) (Swaab, 1982).

Quadro 2. Vantagens dos anticorpos monoclonais e policlonais (Adaptado de Ramos-Vara, 2005).

	Anticorpos policlonais	Anticorpos monoclonais
Origem	Espécies múltiplas	Maioritariamente rato
Afinidade	Variável (alta e baixa)	Sem variação (alta)
Sensibilidade	Elevada	Baixa a moderada
Especificidade	Baixa a alta	Elevada
Conteúdo de Igs irrelevantes	Elevada (10mg/ml)	Cultura celular sobrenadante: ausente Fluido ascítico: 0,5-1,0mg/ml
Caracterização	Maior dificuldade	Maior facilidade
Tolerância à fixação	Elevada	Baixa
Facilidade de obtenção	Fácil obtenção de grandes quantidades	Difícil obtenção de grandes quantidades
Homogeneidade	Variação entre lotes	Sem variação entre lotes (embora para o fluido ascítico possa existir alguma variação)
Custo	Moderado	Elevado

Para além dos anticorpos monoclonais de rato, encontram-se também comercialmente disponíveis anticorpos monoclonais de coelho. A vantagem destes últimos relativamente aos anticorpos monoclonais de rato baseia-se na sua maior afinidade, na adequação para uso em tecidos de rato sem necessidade de procedimentos especiais, bem como no aumento da especificidade, demonstrada em alguns casos e, na possibilidade de se evitarem métodos de recuperação antigénica (Groves & Morris, 2000; Cano *et al.*, 2003; Liguori *et al.*, 2001).

3.6. MÉTODOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

Ainda que existam vários métodos para detecção de anticorpos primários ligados a células ou tecidos, os métodos de marcação através de anticorpos fluorescentes e os métodos que utilizam anticorpos associados a enzimas sinalizadoras, constituem os mais comumente utilizados (Yamashita, 2007).

A reação antígeno-anticorpo não é visível sob microscopia de luz a menos que seja “rotulada”. Desta forma, moléculas marcadoras são associadas a anticorpos primários, secundários ou terciários, de modo a permitir a visualização da reação imunológica. Uma grande variedade de marcadores têm vindo a ser utilizados, incluindo compostos fluorescentes, enzimas e metais (Lucocq & Roth, 1985; Taylor *et al.*, 2002).

3.6.1. MÉTODOS DE DETECÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os métodos de imunofluorescência foram introduzidos por Coons *et al.* (1941) e, desde então, a sua aplicação tem sido demonstrada tanto para diagnóstico como para investigação, podendo ser utilizados com sucesso para a marcação de múltiplos antígenos na mesma preparação. São, no entanto, de uso limitado no diagnóstico de rotina, sendo por isso pouco utilizados, uma vez que as moléculas fluorescentes perdem atividade com o passar do tempo, não permitindo a conservação das lâminas em arquivo. As técnicas de imunofluorescência realizam-se quase sempre em tecido congelado uma vez que o processo de fixação com formol e a inclusão em parafina alteram a estrutura dos tecidos, provocam um aumento dos fenómenos de autofluorescência e o bloqueio de alguns determinantes antigénicos (Robertson *et al.*, 2008).

Nas técnicas de imunofluorescência, os anticorpos são conjugados quimicamente a marcadores fluorescentes (fluorocromos) tais como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), os quais emitem uma fluorescência verde e vermelha, respetivamente (Yamashita, 2007).

3.6.1.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

A imunofluorescência direta (IFD) foi a primeira técnica a ser utilizada, consistindo na pesquisa e na localização de antígenos em células ou tecidos através de um anticorpo purificado específico marcado com o fluorocromo. O conjugado anticorpo-fluorocromo fixa-se ao antígeno formando um imunocomplexo estável (Figura 14), procedendo-se posteriormente a uma lavagem para a retirada

dos conjugados não fixados. A fluorescência pode por fim ser visualizada através de microscopia de fluorescência (Robinson *et al.*, 2009).

3.6.1.1.1. VANTAGENS E DESVANTAGENS

As vantagens deste método incluem períodos de marcação mais curtos, alta especificidade e sensibilidade e possibilidade de detecção de proteínas intracelulares. Por outro lado, um sinal mais fraco, o alto custo do microscópio de fluorescência, a necessidade de um conjugado para cada antígeno que se pretende identificar e a subjetividade da leitura constituem algumas das desvantagens deste método (Robinson *et al.*, 2009).

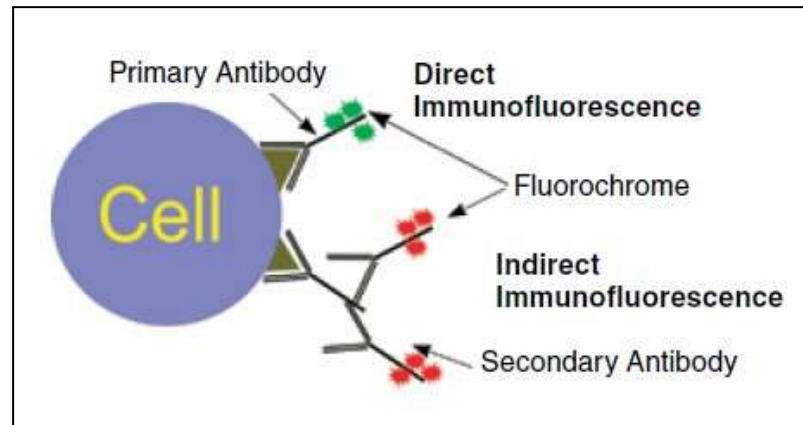


Figura 14. Imunofluorescência direta e indireta (Adaptado de Robinson *et al.*, 2009).

3.6.1.2. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Na imunofluorescência indireta, o anticorpo específico para a molécula de interesse (denominado de anticorpo primário) não possui marcação e, um segundo anticorpo anti-imunoglobulina, dirigido para o primeiro anticorpo, é marcado com o fluorocromo (Figura 13). No entanto, os dois anticorpos devem ser de diferentes espécies de modo a evitar marcação artefactual de antígenos (Robinson *et al.*, 2009).

Embora esta técnica possa ser menos sensível que os métodos enzimáticos, a sensibilidade do corante fluorescente pode ser aumentada através da utilização de

um sistema de amplificação avidina-biotina ou estreptavidina-biotina. Em suma, muitos dos princípios associados à marcação antigénica podem ser aplicados tanto a métodos de imunofluorescência como a métodos enzimáticos. Tal como nos procedimentos enzimáticos, a ordem de marcação, os controlos adequados e as etapas de bloqueio tornam-se fundamentais para a obtenção dos melhores resultados (Robinson *et al.*, 2009).

3.6.1.2.1. VANTAGENS E DESVANTAGENS

As vantagens deste método relativamente ao método direto incluem uma maior sensibilidade, uma maior amplificação do sinal (mais do que um anticorpo secundário pode estabelecer ligação com o anticorpo primário), é de simples padronização e execução e, para além disso, o mesmo conjugado pode ser usado em sistemas diferentes. Como desvantagens podem apontar-se a potencial reatividade cruzada, a necessidade de encontrar anticorpos primários que não tenham sido criados nas mesmas espécies ou de diferentes isotipos quando se executam procedimentos de marcação múltipla e ainda o facto das amostras que possuem imunoglobulinas endógenas poderem produzir elevada coloração de fundo (Robinson *et al.*, 2009).

O método de imunofluorescência mais utilizado é o indireto, no entanto, em algumas aplicações específicas, a imunofluorescência direta tem sido usada para localização de imunoglobulinas em imunocomplexos ao longo da junção dermo-epidérmica de biópsias de pele (Jennette & Wick, 1998).

Sumariamente, a imunofluorescência consiste na visualização de antígenos celulares através da utilização de sondas fluorescentes. Os resultados são numerosos e a técnica tem provado ser uma ferramenta para determinar a distribuição celular de antígenos conhecidos em tecidos congelados e na localização de sequências específicas de DNA nos cromossomas. O método alcançou o seu estatuto combinando elevada sensibilidade com alta resolução na visualização de antígenos, sendo considerada como uma ferramenta que não pode ser ignorada pelos patologistas (Robinson *et al.*, 2009). Contudo, como anteriormente referido, a sua utilização no diagnóstico de rotina, para tecidos fixados

em formol, torna-se limitada, uma vez que este processo de fixação, assim como a inclusão em parafina, alteram a morfologia estrutural dos tecidos, provocam um aumento dos fenómenos de autofluorescência e o bloqueio de alguns determinantes antigénicos, facto pelo qual a sua utilização é mais comum em tecidos congelados (Robertson *et al.*, 2008).

A grande desvantagem do método de imunofluorescência quando comparado com o método de detecção por enzimas sinalizadoras reside na incapacidade de observação da morfologia das células e tecidos marcados pelo anticorpo fluorescente (Yamashita, 2007).

3.6.2. MÉTODOS DE DETECÇÃO IMUNOENZIMÁTICA

Uma vez que as amostras fixadas em formol e embebidas em parafina constituem uma mais valia ao nível da observação morfológica dos tecidos, este método passou a ser considerado de eleição para a maioria dos estudos clínicos e de investigação. O método do anticorpo marcado com peroxidase, introduzido em 1968, tornou-se a primeira aplicação prática de anticorpos a tecidos parafinados, ultrapassando algumas das limitações associadas aos métodos de imunofluorescência (Nakene, 1968). O sucesso da aplicação dos métodos imunohistoquímicos a peças cirúrgicas fixadas em formol tornou-se um estímulo para o rápido progresso neste novo e emergente campo (Mason & Phifer, 1969; Sterberger *et al.*, 1970).

Os métodos de marcação imunoenzimáticos utilizam reações do tipo enzima-substrato, sendo que os marcadores mais comuns englobam enzimas tais como peroxidase (horseradish peroxidase), fosfatase alcalina (calf intestine alkaline phosphatase), glucose oxidase, beta-galactosidase, entre outras. As enzimas, na presença de um substrato específico e de um cromogénio, produzem um precipitado colorimétrico no local da reação Ag-Ac. A seleção do sistema de detecção é muito importante uma vez que a sensibilidade de uma reação imunológica irá depender em grande parte do sistema escolhido (Ramos-Vara, 2005).

Os sistemas de detecção podem ser classificados como diretos ou indiretos.

3.6.2.1. SISTEMAS DE DETECÇÃO DIRETOS

Constitui o sistema mais simples dos métodos imunohistoquímicos. A reação engloba um sistema de uma única etapa, utilizando somente um anticorpo primário que possui uma molécula marcadora, o que significa que o anticorpo que possui o marcador se liga diretamente ao antígeno (Figura 14) (Coons & Kaplan, 1950). Diferentes marcadores têm sido usados, incluindo fluorocromos, enzimas, ouro coloidal e biotina (Polak & Van Noorden, 2003). Caracteriza-se como um método rápido e simples mas que não oferece sensibilidade suficiente para a maioria dos antígenos usados rotineiramente (Ramos-Vara, 2005).

3.6.2.2. SISTEMAS DE DETECÇÃO INDIRETOS

3.6.2.2.1. SIMPLES

A necessidade de uma deteção antigénica mais sensível levou Coons e seus colaboradores a desenvolver um método composto por duas etapas. O primeiro estrato/camada de anticorpos não possui marcação, no entanto, a segunda camada, sobreposta sobre o anticorpo primário é marcada (Figura 15) (Polak & Van Noorden, 2003).

A sensibilidade deste método é mais elevada quando comparado com o método direto porque: 1) o anticorpo primário como não é marcado, mantém a sua atividade dando origem a um sinal mais intenso e 2) o número de marcadores (ex. peroxidase) por molécula de anticorpo primário é maior, aumentando desta forma a intensidade da reação. O resultado é demonstrado na capacidade para detetar menores quantidades de antígeno ou no aumento da diluição do anticorpo primário pois, pelo menos duas imunoglobulinas (Igs) marcadas têm a possibilidade de se ligar a cada molécula de anticorpo primário. Estes métodos são também mais convenientes que os métodos diretos uma vez que o mesmo anticorpo secundário pode ser usado para detetar diferentes anticorpos primários, desde que estes últimos sejam provenientes da mesma espécie (Polak & Van Noorden, 2003).

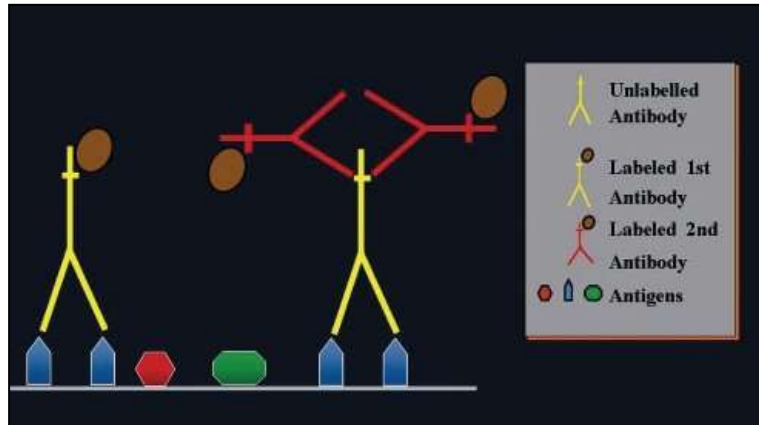


Figura 15. Método direto e indireto de uma reação de imunoperoxidase (Adaptado de Ramos-Vara, 2005).

3.6.2.2.2. MÉTODO PAP (PEROXIDASE ANTI-PEROXIDASE)

O método indireto PAP consiste num sistema de três camadas (Sternberger *et al.*, 1970). Neste método, é aplicado o anticórprio primário dirigido contra o antígeno a detetar. Posteriormente, é aplicado o anticórprio secundário ou de ponte, dirigido contra as imunoglobulinas da espécie animal em que foi produzido o anticórprio anterior. Este método possui ainda uma terceira camada obtida pela aplicação do complexo PAP (para um anticórprio primário de coelho é uma antiperoxidase de coelho associada a uma peroxidase, numa tal proporção que dá origem a um complexo estável - peroxidase-antiperoxidase) composto por duas moléculas IgG de coelho combinadas com três moléculas peroxidase. O complexo PAP deve ser produzido na mesma espécie animal do anticórprio primário, de modo a que o anticórprio secundário possa estabelecer a ponte entre os dois (Figura 16) (Polak & Van Noorden, 2003).

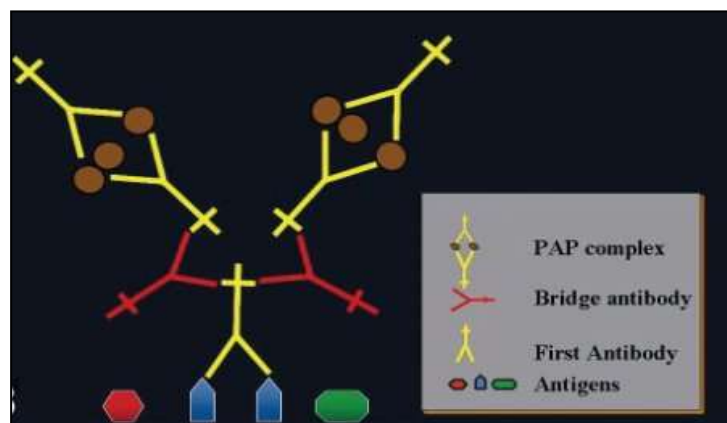


Figura 16. Método indireto peroxidase-antiperoxidase (PAP) (Adaptado de Ramos-Vara, 2005).

A primeira e a terceira camada encontram-se ligadas por uma segunda camada (“*bridge*”) de Igs (neste caso um anticorpo anti-coelho). A chave reside na adição em excesso do segundo anticorpo, de forma a que ocorra a sua ligação tanto ao anticorpo primário (através de um local de ligação do anticorpo) como ao complexo PAP (através do seu outro local disponível para ligação a anticorpos). Este método possui uma sensibilidade 100-1000 vezes superior quando comparado com o método indireto de duas etapas, contudo, torna-se mais complexo e trabalhoso. Permite também o aumento das diluições do anticorpo primário e, conseqüentemente, a diminuição da marcação de fundo. Os reagentes associados ao complexo PAP encontram-se disponíveis para interagir com anticorpos primários de diversas espécies, entre as quais cabra, rato, ratinho, humana (Taylor *et al.*, 2002). Ainda que este método tenha sido muito utilizado antes do aparecimento dos sistemas avidina-biotina, atualmente, a sua aplicação tem sido limitada (Ramos-Vara, 2005).

3.6.2.2.3. MÉTODO APAAP (Alkaline phosphatase anti Alkaline phosphatase)

Este método é semelhante ao PAP, no entanto, utiliza como molécula sinalizadora a fosfatase alcalina em vez da peroxidase. É bastante utilizado em situações que, pela sua natureza, impeçam ou dificultem a utilização dos métodos de imunoperoxidase, como, por exemplo, lâminas de citologia com muitos eritrócitos (Polak & Van Noorden, 2003).

3.6.2.3. SISTEMAS DE DETEÇÃO AVIDINA-BIOTINA

Na década de 80 (1981) uma nova geração de procedimentos imunohistoquímicos emergiu com a introdução dos métodos avidina-biotina, os quais permanecem em utilização até aos dias de hoje. Todos estes métodos dependem da grande afinidade da avidina ou da estreptavidina para a vitamina biotina (Hsu *et al.*, 1981).

Os métodos indiretos através do complexo avidina-biotina (ABC – avidin biotin complex) permitiram a aplicação da imunohistoquímica em amostras frescas e

tecidos fixados, aumentando a aplicabilidade desta técnica no diagnóstico de rotina (Leong & Wright, 1987; Taylor & Cote, 1994; Rosai, 1996; Swanson, 1997; Bodey, 2002; Werner *et al.*, 2005).

A avidina é uma glicoproteína extraída a partir da clara de ovo que possui quatro locais de ligação por molécula e grande afinidade para uma vitamina de baixo peso molecular designada biotina. Esta última possui um local de ligação para a avidina, podendo ligar-se, através de outros locais, a um anticorpo (anticorpo biotinilado) ou a quaisquer outras macromoléculas, tais como enzimas, fluorocromos ou outros marcadores (Polak & Van Noorden, 2003). O aumento da sensibilidade criada pelo método avidina-biotina resulta da grande quantidade de moléculas de biotina (e, por conseguinte, moléculas marcadoras) que se podem ligar a um anticorpo primário (Guesdon *et al.*, 1979; Hsu *et al.*, 1981; Hsu & Raine, 1982).

Um dos métodos mais utilizados é o complexo avidina-biotina-peroxidase (avidin-biotin-peroxidase complex – ABC) (Figura 17A). Neste caso, o segundo anticorpo é biotinilado e o terceiro reagente é um complexo de avidina associada a biotina, esta última ligada a um marcador específico. Antes de serem aplicadas, a avidina e a biotina marcada são deixadas a reagir conjuntamente por cerca de trinta minutos, resultando na formação de um grande complexo com numerosas moléculas marcadoras (ex. enzimas). A proporção de avidina para biotina marcada deve ser feita na medida em que alguns locais de ligação da avidina à biotina marcada são deixados livres para anexação da biotina ao anticorpo secundário (Polak & Van Noorden, 2003).

Outro método avidina-biotina muito utilizado é o complexo marcador avidina-biotina (labeled avidin-biotin - LAB) e o complexo marcador estreptavidina-biotina (labeled streptavidin-biotin – LSAB) (Figura 17B). Estes métodos utilizam igualmente um anticorpo primário aplicado contra o antigénio pretendido, seguindo-se a introdução de um anticorpo secundário biotinilado dirigido contra o anticorpo primário. Posteriormente, faz-se a aplicação de avidina ou de estreptavidina marcadas com uma substância que proporcione visualização, a qual poderá ser uma peroxidase (ou fosfatase alcalina). A sensibilidade deste método é mais elevada que o método standard ABC (Elias *et al.*, 1989).

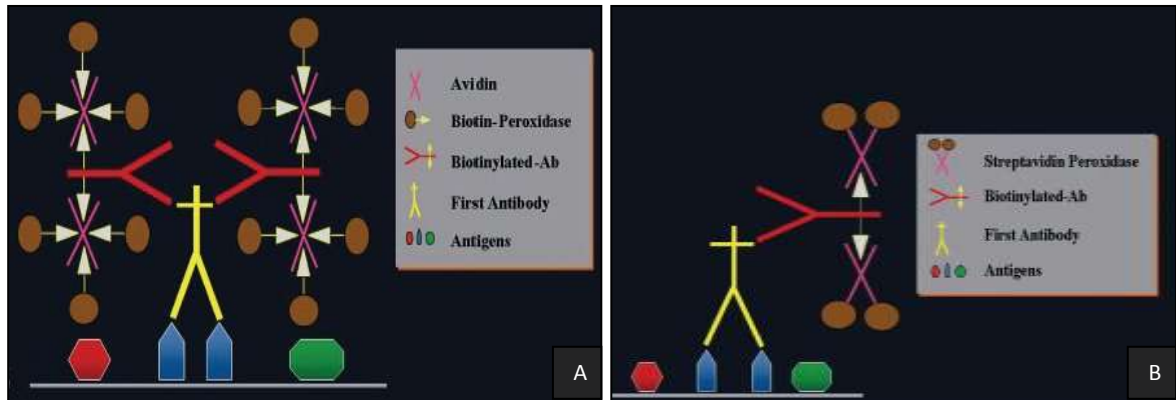


Figura 17. Método imunohistoquímico através de: A) complexo avidina-biotina (avidin-biotin-peroxidase complex – ABC) e B) complexo marcador estreptavidina-biotina (labeled streptavidin-biotin complex – LSAB) (Adaptado de Ramos-Vara, 2005).

Uma das principais desvantagens de qualquer sistema avidina-biotina é a possibilidade de produzir elevado fundo. A avidina pode produzir fundo ligando-se a lectinas do tecido através de seus grupos de carboidratos e, também, através de ligações eletrostáticas, pois o seu ponto isoelétrico (pI) é 10. Este fundo pode ser reduzido através da substituição de avidina por estreptavidina. A estreptavidina, produzida pela bactéria *Streptomyces avidinii*, possui um pI neutro, resultando numa acentuada redução das interações eletrostáticas com os elementos presentes no tecido. Além disso, por não possuir a capacidade de se ligar a lectinas, existe uma menor probabilidade de surgir coloração de fundo. No entanto, o possível fundo criado a partir da biotina endógena constitui ainda uma possibilidade com os métodos de avidina/estreptavidina, particularmente quando são usados processos severos de recuperação antigénica. Este facto é particularmente comum em tecidos ricos em biotina, tais como o fígado e o rim e, embora o processo de fixação em formol e a embebição em parafina possam reduzir a expressão da biotina endógena, alguma atividade residual pode permanecer. Para superar os problemas provocados pela biotina endógena pode ser realizada uma técnica de bloqueio que consiste na aplicação, no início da técnica de IHQ, de avidina livre que se irá ligar à biotina endógena, bloqueando-a. Seguidamente, é aplicada biotina livre para bloqueio dos pontos ativos livres da avidina previamente aplicada, que, entretanto, se ligou ao tecido via biotina endógena. Desta forma, no local onde existia uma molécula de biotina passa a existir um complexo de avidina-biotina completamente desativado (Polak & Van Noorden, 2003). Os procedimentos para bloqueio da biotina endógena

deverão ser efectuados imediatamente após qualquer tratamento de recuperação antigénica mediado pelo calor ou digestão enzimática e previamente à incubação do anticorpo primário. Muitas empresas comercializam sistemas para bloqueio da biotina endógena, no entanto, ainda que bastante satisfatórios, tornam-se demasiado dispendiosos. Uma solução de bloqueio eficaz que ajudará a diminuir o fundo inespecífico poderá consistir na incubação das secções em solução de clara de ovo diluída (como fonte de avidina; 2 claras de ovo diluídas em 200ml de água destilada), seguida de lavagem em água destilada e posterior incubação em solução de leite em pó desnatado 5% (como fonte de biotina) ou 0,2% de biotina em PBS (Rodney & Miller, 2001).

Os métodos imunohistoquímicos baseados no complexo avidina-biotina ou no complexo estreptavidina-biotina são atualmente os mais utilizados pois possuem grande versatilidade e grande sensibilidade, permitindo a detecção de pequenas quantidades de antígeno. Estas características promovem o aumento da qualidade da marcação em casos de fixação prolongada ou processamento deficiente e a diminuição do tempo de duração e dos custos da técnica. Possibilitam igualmente um incremento da qualidade da marcação, com maior intensidade e melhor aspeto visual. Para além disso, promovem a diminuição de fundo inespecífico e elevada especificidade. Contudo, a alta sensibilidade pode trazer consequências negativas, tais como a ampliação do sinal de pequenas quantidades de biotina endógena ou a ampliação do sinal de pequenas quantidades de anticorpo primário ligado inespecificamente (Ramos-Vara, 2005).

3.6.2.4. SISTEMA DO POLÍMERO

Tendo em conta as limitações descritas anteriormente, surgiu no mercado um novo sistema de detecção que não depende da biotina e que tem vindo a ganhar franca popularidade (Heras *et al.*, 1995). Este método utiliza uma tecnologia única baseada no esqueleto interno de um polímero compacto ao qual se fixam múltiplos anticorpos secundários (específicos para o anticorpo primário) e múltiplas moléculas enzimáticas marcadoras (Figura 18) (Ramos-Vara, 2005).

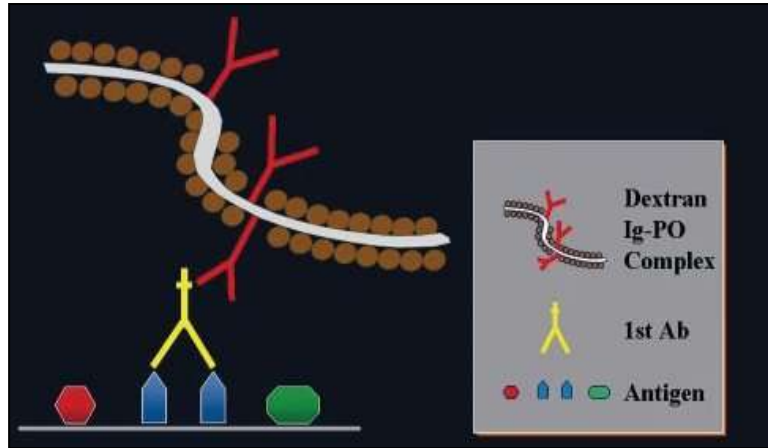


Figura 18. Método indireto através do polímero (Adaptado de Ramos- Vara, 2005).

Este método engloba duas variantes, o polímero de esqueleto interno direto (EPOS –Enhanced Polymer One Step) e o polímero de esqueleto interno indireto (Envision). No método direto, o polímero é constituído pelo esqueleto de dextrano, ao qual se associam anticorpos primários e substâncias que propiciam a visualização (normalmente peroxidase). Trata-se de um método de extrema rapidez (um só passo) e de fácil execução, evidenciando uma diminuição de fatores de erro, contudo, possui baixo poder de amplificação e torna-se relativamente dispendioso, existindo poucos anticorpos primários comercializados desta forma (Ramos-Vara, 2005).

No método de esqueleto interno indireto introduz-se um anticorpo primário dirigido contra o antigénio pretendido e, posteriormente, aplica-se um polímero ao qual estão acoplados anticorpos secundários e substâncias propiciadoras de visualização (normalmente HRP). De igual forma, constitui um método extremamente rápido (2 passos) e de fácil execução, evidenciando uma diminuição de fatores de erro. Adicionalmente, é um método que promove a amplificação, deslocando bastantes moléculas propiciadoras de visualização por molécula de antigénio, no entanto, o facto de ser relativamente dispendioso torna-se uma desvantagem (Ramos-Vara, 2005).

As vantagens apresentadas pelo método do polímero relativamente aos outros métodos consistem: 1) na sua simplicidade quando comparado com o método de três etapas, 2) na sua semelhante ou mais elevada sensibilidade relativamente aos métodos ABC ou LAB/LSAB e 3) na ausência de coloração de fundo provocada

pela avidina e biotina endógenas. Como principal desvantagem apresenta o facto de se tornar um método mais dispendioso do que os métodos avidina-biotina (Sabattini *et al.*, 1998; Vyberg & Nielsen, 1998; Shi *et al.*, 1999; Petrosyan *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Ramos-Vara, 2005).

3.6.2.5. SISTEMA DA AMPLIFICAÇÃO DA TIRAMINA

Este método baseia-se na capacidade da tiramina em aderir quimicamente a um substrato sólido (ex. amostra de tecido) após processos de oxidação/redução. Posteriormente adaptado para imunohistoquímica por Adams 1992, este processo tem por base a deposição de tiramina biotinilada no local da reação Ag-Ac, catalizada por “*horseradish peroxidase*” (HRP). Os intermediários altamente reativos que se formam durante a reação HRP-tiramina irão ligar-se a porções de proteínas ricas em tirosina que se encontram na vizinhança dos locais de ligação da enzima HRP, através da produção de radicais livres originados a partir do oxigénio libertado pela HRP (Figura 19).

Esta reação é de curta duração e, por esta razão, a deposição de tiramina biotinilada ocorre apenas no local ou na proximidade imediata onde é gerada. O complexo biotina-tiramina é subsequentemente utilizado para fixação da avidina conjugada com a enzima HRP (Hayat, 2002).

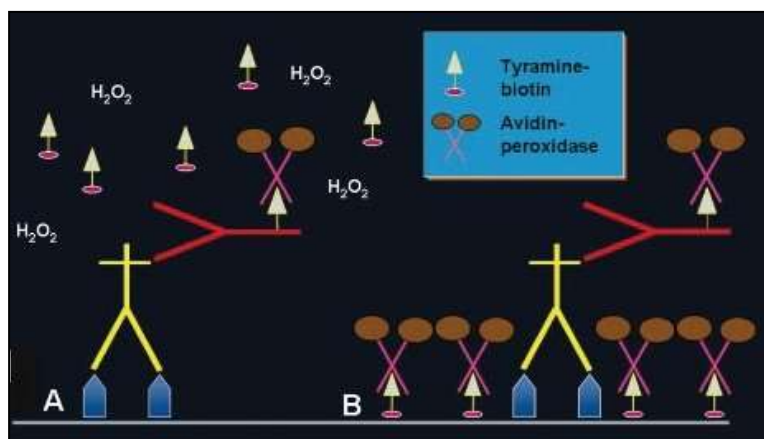


Figura 19. Método de amplificação da tiramina. A) os primeiros passos constituem um procedimento LSAB. Posteriormente, a tiramina biotinilada é adicionada e precipita com a peroxidase junto dos locais de ligação Ag-Ac. B) a adição de mais moléculas de avidina-peroxidase permite amplificar o sinal (Adaptado de Ramos-Vara, 2005).

Este método reveste-se de maior complexidade e torna-se mais laborioso, na medida em que envolve um procedimento inicial avidina-biotina seguido posteriormente pela reação tiramina. No entanto, alguns autores consideram que a sua sensibilidade pode ser aumentada em 5 a 10 vezes em comparação com o método de avidina-biotina, sendo que outros afirmam que este aumento pode ser ainda maior (Merz *et al.*, 1995; Speel *et al.*, 1999).

Este sistema de deteção é considerado adequado quando, no tecido, os antigénios estão presentes em muito baixa quantidade. No entanto, o aparecimento de coloração de fundo pode tornar-se um problema, particularmente com a utilização de sistemas de recuperação de epítomos induzidos pelo calor (Hasui *et al.*, 2002). Neste caso, para anular a peroxidase endógena ou a atividade endógena do complexo avidina-biotina, é necessário recorrer a tratamentos mais prolongados. Modificações deste método utilizando tiramina fluoresceínada demonstraram uma acentuada redução ou até mesmo um desaparecimento completo do fundo criado pela biotina endógena (Van Gijlswijk *et al.*, 1997; Hasui *et al.*, 2002).

Depois de conhecidos os vários métodos imunohistoquímicos, uma das grandes responsabilidades técnicas enfrentadas no laboratório reside na seleção do método mais adequado. Dada a sua flexibilidade e baixo custo, os protocolos mais correntemente utilizados são indiretos, requerendo por conseguinte várias etapas de incubação. A alta sensibilidade pode ser obtida através da aplicação de princípios imunológicos, reações de amplificação enzimática e/ou com a utilização de complexos avidina-biotina, no entanto, as várias etapas devem ser rigorosamente seguidas de forma a evitar interações indesejadas. É fundamental que, no planeamento técnico, todos os reagentes sigam a sequência rigorosamente estabelecida, devendo ser elaborado um diagrama de fluxo, que se torna muito útil para evitar o aparecimento de falsos resultados. Anotações relativas a todas as fases da reação, assim como informações sobre o padrão de cada anticorpo tornam-se também importantes, sendo sugeridas para padronização de programas técnicos (Alves *et al.*, 1999).

3.6.3. CROMOGÉNIOS

A reação antigénio-anticorpo apenas se torna visível microscopicamente se a esta se encontrar associada um determinado rótulo. As marcações mais comumente utilizadas incluem enzimas, particularmente peroxidase e fosfatase alcalina. Cada uma destas enzimas possui substratos e cromogénios específicos, de forma a dar origem a um precipitado colorimétrico. A grande maioria dos cromogénios utilizados em imunohistoquímica confere à reação uma coloração que pode variar entre o castanho, vermelho ou azul. A escolha da enzima e do cromogénio irá depender de vários fatores (por exemplo, da intensidade da reação, localização do antigénio, presença ou ausência de pigmentos endógenos, meio de montagem utilizado), mas, na grande maioria das vezes, depende da preferência pessoal (Van Hecke, 2002). Muitos laboratórios preferem a peroxidase, contudo, a fosfatase alcalina constitui igualmente uma opção válida (Mason & Sammons, 1978). Para sistemas de deteção imunohistoquímicos baseados numa reação “*horseradish peroxidase*”, o composto DAB (3,3-diaminobenzidina tetrahydrochloride) é o cromogénio mais utilizado, conferindo uma coloração castanha à reação, sendo também um composto insolúvel em solventes orgânicos. Nos casos em que se verifique elevada atividade da peroxidase endógena ou predominância de pigmento melânico, o composto DAB não constitui a melhor opção (Taylor *et al.*, 2002). Em qualquer uma destas situações, deve considerar-se a utilização de fosfatase alcalina ou, como alternativa, recorrer a outros cromogénios, tais como o composto AEC (3-amino-9-ethylcarbazole), também usado para peroxidase e que confere cor vermelha à reação. É necessário ter em atenção que quando se utiliza este cromogénio, a montagem entre lâmina e lamela deve ser realizada com meio de montagem adequado, nomeadamente solúvel em água (o precipitado colorimétrico é “lavado” em presença de solventes orgânicos). Outro cromogénio também utilizado em reações de peroxidase é o 4-cloro-1-naftol que precipita sob a forma de um produto de cor azul, solúvel em solventes orgânicos. Para reações de fosfatase alcalina, mais recomendadas para imunocitoquímica de amostras citológicas, a associação dos compostos BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato; substrato) e NBT (nitroblue tetrazólio; cromogénio), dando origem a um precipitado que varia de azul a negro, insolúvel em solventes orgânicos, assim como a utilização de Fast-Red TR e

Fast-Blue BB, que dão origem a precipitados de cor vermelha e azul brilhante, respetivamente, sendo insolúveis em álcool e solventes orgânicos e também da Fucsina (cromogénio) que produz um tom avermelhado, sendo insolúvel no álcool e nos solventes orgânicos, constituem o grupo dos mais utilizados (Boenisch, 2001).

A escolha da coloração de contraste irá depender sobretudo da cor da reação imunológica, isto é, a contra-coloração deverá produzir suficiente contraste de forma a evitar conflito com o precipitado formado pelo cromogénio. As colorações de contraste mais vulgarmente utilizadas incluem a hematoxilina (azul), verde metilo (methyl green -verde) e o vermelho rápido nuclear (nuclear fast red - vermelho) (Van Hecke, 2002). A coloração de contraste deve corar levemente os tecidos sem interferir com o precipitado do cromogénio, sendo que, em determinadas situações, particularmente com a presença de pequenas quantidades de Ags nucleares, não é recomendada (Ramos-Vara, 2005).

3.6.4. VALIDAÇÃO DE RESULTADOS

3.6.4.1. CONTROLOS

Em relação à validação dos resultados e sua interpretação, é necessário observar os padrões de reatividade dos controlos negativo e positivo, assim como dos controlos interno e externo. Os controlos externos (secções histológicas de tecidos com afinidade para determinado anticorpo) devem ser incluídos em cada painel e preparados a partir de amostras fixadas e sujeitas às mesmas condições que os casos de teste. Deve também ser dada especial atenção à reatividade de estruturas presentes na lâmina do caso em estudo, as quais poderão vir a ser utilizadas como futuros controlos positivos internos. De modo semelhante, as estruturas conscientemente negativas para um determinado marcador podem oferecer um excelente controlo interno negativo, uma vez que foram submetidas ao mesmo tratamento que o tecido teste. Casos em que o controlo positivo não atue da forma esperada levam à invalidação dos resultados das amostras testadas. O modo de atuação é semelhante em situações nas quais ocorra marcação positiva do controlo negativo (Elias *et al.*, 1989; Elias, 1990; Taylor, 1994; Taylor & Cote, 1994; Alves *et al.*, 1999).

3.6.4.2. MARCAÇÃO INESPECÍFICA/MARCAÇÃO DE FUNDO E SUAS PRINCIPAIS CAUSAS DE ORIGEM

A coloração de fundo/marcação não específica constitui um dos problemas mais comuns em imunohistoquímica, podendo afetar de forma significativa a interpretação de uma reação imunológica. A especificidade de um anticorpo refere-se à sua capacidade em reconhecer e estabelecer ligações com antigénios específicos. Aplicando este conceito à marcação imunohistoquímica, pode caracterizar-se como inespecífica a presença de marcação em células ou em estruturas intra ou extra-celulares que não deveriam estar marcadas (marcando-as de forma semelhante à marcação específica), uma vez que o anticorpo não é dirigido contra elas. Por sua vez, a coloração de fundo caracteriza-se pela marcação dispersa e irregular de diferentes estruturas celulares (Ramos-Vara, 2005).

3.6.4.2.1. ATIVIDADE DA PEROXIDASE ENDÓGENA

A atividade da peroxidase endógena pode ser definida como qualquer atividade que resulte na decomposição da molécula H_2O_2 . Esta atividade enzimática é propriedade comum de todas as hemoproteínas, tais como a hemoglobina (células vermelhas do sangue), mioglobina (células musculares), citocromo (granulócitos e monócitos) e catalases (fígado e rim). Também se pode encontrar em áreas de tecido adjacentes a zonas vascularizadas devido à difusão sanguínea que ocorre antes da fixação. Desta forma, a peroxidase endógena pode reagir com o cromogénio DAB produzindo um produto de cor castanha que se torna indistinguível da imunocoloração específica (Elias, 2003). Embora a atividade da peroxidase endógena seja destruída quase por completo durante o processo de fixação em formalina, o pré-tratamento das secções de tecido com uma solução diluída (0,003-3%) de H_2O_2 em metanol irá reduzir de forma significativa ou neutralizar completamente a atividade da peroxidase nestes diferentes tipos celulares (Figura 20) (Streefkerk, 1972; Straus, 1974). Em cortes de tecidos com abundante hemorragia ou com presença de hematina ácida, pode ser necessária uma solução mais forte (10%) de H_2O_2 para remover a atividade endógena ou então um período de incubação mais longo em soluções menos concentradas (Straus, 1979; Elias,

2003). A utilização de H_2O_2 em metanol não é recomendada para espécimes nos quais se pretende efetuar a detecção de antígenos na superfície celular, sendo também inadequada a sua utilização (metanol) em criosecções uma vez que pode ocorrer desprendimento do tecido da lâmina de vidro (Boenisch, 2001). Nestes casos, a supressão da atividade da peroxidase endógena pode ser realizada através de uma mistura de H_2O_2 (0,3%) em 0,1% de azida sódica ou H_2O_2 diluída em água destilada. A marcação de fundo/markação inespecífica derivada da atividade da peroxidase endógena pode tornar-se ainda mais evidente com o uso de sistemas de detecção muito sensíveis. Para reduzir este problema, a concentração de H_2O_2 deve ser aumentada ou então ser utilizada uma enzima alternativa. Em tecidos ricos em peroxidase endógena este problema pode ser reduzido pela utilização de métodos de detecção que utilizam fosfatase alcalina ao invés dos métodos baseados na peroxidase (Elias, 2003).

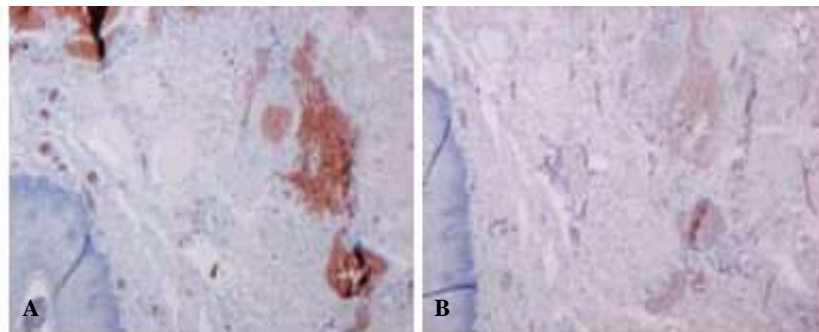


Figura 20. Células sanguíneas demonstrando atividade da peroxidase endógena. A) antes e B) após tratamento com peróxido de hidrogénio a 3% (Adaptado de Wendelboe & Bisgaard, 2009).

3.6.4.2.2. ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA ENDÓGENA

A utilização da fosfatase alcalina como uma molécula marcadora tem vindo a aumentar de forma significativa uma vez que facilita a dupla imunomarcação e evita a maioria dos problemas associados à atividade da peroxidase endógena encontrada no tecido hematopoiético. Nos tecidos de mamíferos existem duas isoenzimas da fosfatase alcalina capazes de produzir coloração de fundo: forma intestinal e não intestinal. A forma não intestinal é facilmente inibida através de uma solução 1 mM de levamisole (L tetramisole) (Figura 21), ao passo que a isoenzima

de intestino de bezerro, muito utilizada como molécula marcadora em métodos imunoalcalinos, não é afetada por esta solução (Ponder & Wilkinson, 1981). A isoforma intestinal pode ser bloqueada com ácido acético 1%, contudo, este procedimento é suscetível de danificar alguns antigénios (Polak & Van Noorden, 2003). A fosfatase alcalina endógena é também destruída no decorrer dos processos de fixação em formalina e subsequente processamento de tecidos (Elias, 2003).

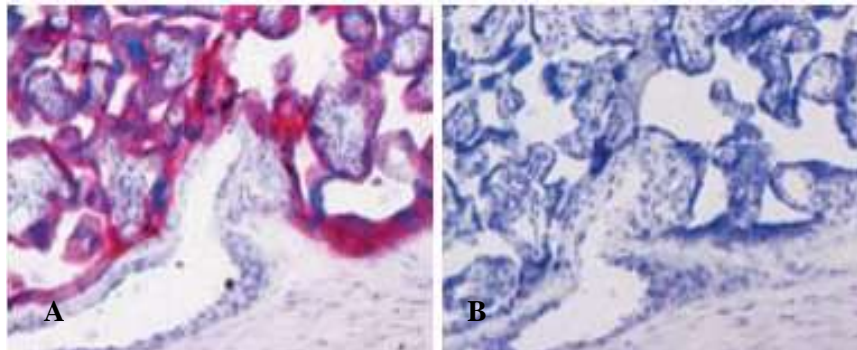


Figura 21. Placenta demonstrando atividade da fosfatase alcalina endógena. A) antes e B) após tratamento com levamisole (Adaptado de Wendelboe & Bisgaard, 2009).

3.6.4.2.3. ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS AVIDINA E BIOTINA

Uma vez que a presença de avidina endógena é constante numa grande variedade de tecidos, não é de estranhar que a sua atividade ligante tenha sido registada em todas as técnicas que utilizam biotina, sendo a sua observação mais notória dentro do citoplasma das células e, particularmente, em secções de tecido congelado (Robinson *et al.*, 2009).

A elevada atração iónica da proteína avidina, presente numa forma ativa em ovos crus, para moléculas celulares de carga negativa oposta, tais como ácidos nucléicos, fosfolípidos e glicosaminoglicanos no citoplasma de mastócitos, pode resultar em ligações não específicas (Wood & Borden, 1977). A avidina presente na clara de ovo tem o seu pI (valor de pH onde existe equivalência entre as cargas positivas e negativas da molécula) a um pH 10,0 e possui uma carga básica positiva no valor de pH comumente utilizado na imunocoloração, ou seja, quase neutro. Esta ligação não imune da avidina pode ser evitada através da utilização de soluções ABC (complexo avidina-biotina-peroxidase) ou soluções LSAB (complexo

estreptavidina-biotina-peroxidase) em pH 9,4 em vez de 7,6, ou, por adição de uma solução de leite em pó desnatado a 5% (Wood & Borden, 1977; Bussolati & Gugliotta, 1983; Duhamel & Johnson, 1985). A substituição da avidina da clara de ovo por estreptavidina (a partir de *Streptomyces avidinii*), a qual possui um pI de 5,5-6,5 a um pH fisiológico, reduz significativamente a ligação inespecífica em métodos imunohistoquímicos (Naritoku & Taylor, 1982; Bussolati & Gugliotta, 1983; Yagi *et al.*, 2002).

A biotina endógena encontra-se amplamente dispersa em tecidos de mamíferos, particularmente no fígado, pulmões, baço, tecido adiposo, glândula mamária, rins e cérebro (Wood & Borden, 1977; Naritoku & Taylor, 1982; Bussolati *et al.*, 1997; Yagi *et al.*, 2002). A coloração de fundo originada pela biotina endógena é muito reduzida após fixação em formalina, mas pode ser bastante pronunciada em secções congeladas (Boenisch, 2001). A ligação da avidina, utilizada nos sistemas de detecção, à biotina endógena pode produzir fundo intenso, tornando-se necessária a sua inibição (Elias, 2003). Esta ligação pode ser suprimida com recurso a tampões alcalinos, pré-incubação das secções de tecido com avidina e biotina não marcadas ou incubação com leite em pó desnatado (Banerjee & Pettit, 1984; Johnson *et al.*, 1984; Duhamel & Johnson, 1985). Existem no mercado kits comerciais que contêm 0,1% de estreptavidina e 0,01% de biotina, os quais possuem a capacidade de bloquear esta atividade endógena, no entanto, podem interferir com a interpretação da coloração nuclear dos antígenos (marcadores de proliferação, infeções por herpes) (Ramos-Vara, 2005).

3.6.4.2.4. INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS DAS PROTEÍNAS

Em meios aquosos, as interações hidrofóbicas entre macromoléculas ocorrem quando a sua tensão superficial é inferior à da água. As forças hidrofóbicas constituem a chave para o sucesso de uma ligação Ag-Ac, contudo, podem também ser responsáveis pelo indesejável aparecimento de fundo não específico. As proteínas tecidulares tornam-se mais hidrofóbicas através da fixação com agentes aldeídos, em resultado das ligações cruzadas que ocorrem entre os aminoácidos reativos alfa e epsilon, tanto dentro como entre proteínas tecidulares adjacentes (Boenisch, 2001). O aumento da hidrofobicidade das proteínas durante o processo

de fixação promove o aparecimento de coloração de fundo em procedimentos imunohistoquímicos. Desta forma, torna-se importante evitar fixações prolongadas em formalina ou outro fixador contendo aldeídos. Esta coloração de fundo resultante de uma excessiva fixação pode ser atenuada através de uma pós-fixação com líquido de Bouin ou de Zenker (Caron & Banks, 1979). As imunoglobulinas são também proteínas muito hidrofóbicas, particularmente as pertencentes às subclasses IgG₁ e IgG₃. Fenómenos de agregação e polimerização levam a um aumento da hidrofobicidade, causando problemas durante o processo de armazenamento de imunoglobulinas. Interações proteína-proteína entre conjugados e grupos polares presentes nos tecidos levam igualmente ao aparecimento de fundo não específico (Pino, 1985). Outra causa responsável pelo aumento da hidrofobicidade das imunoglobulinas é a biotinylation dos anticorpos, podendo originar modificações no seu ponto isoelétrico (Wadsley & Watt, 1987).

Vários métodos podem ser utilizados de forma a reduzir as ligações hidrofóbicas entre as imunoglobulinas e as proteínas dos tecidos, os quais incluem tampões de diluição com pH diferente do pI do anticorpo (particularmente no caso de anticorpos monoclonais), diluidores com baixa força iónica (baixa concentração de sais), adição de detergentes não iónicos (Tween 20, Triton X) ou de etilenoglicol aos diluidores ou, aumentando o pH do diluidor utilizado para anticorpos policlonais (Juhl *et al.*, 1984; Pino, 1985; Boenisch, 2001). No entanto, o método mais comum para reduzir a coloração de fundo inespecífico causada pelas interações hidrofóbicas será provavelmente a utilização de proteínas bloqueadoras antes da incubação do anticorpo primário (Figura 22). Classicamente, este método tem sido usado com imunoglobulinas da mesma espécie, para ligações secundárias ou anticorpos marcadores, no entanto, a albumina sérica bovina (BSA), gelatina de peixe, soro fetal de vitelo, leite em pó desnatado e, mais recentemente, caseína, podem também ser utilizados para este efeito, sendo que esta última parece ser mais eficaz do que o soro normal no bloqueio da coloração de fundo não específico resultante de interações hidrofóbicas (Duhamel & Johnson, 1985; Tacha & McKinney, 1992).

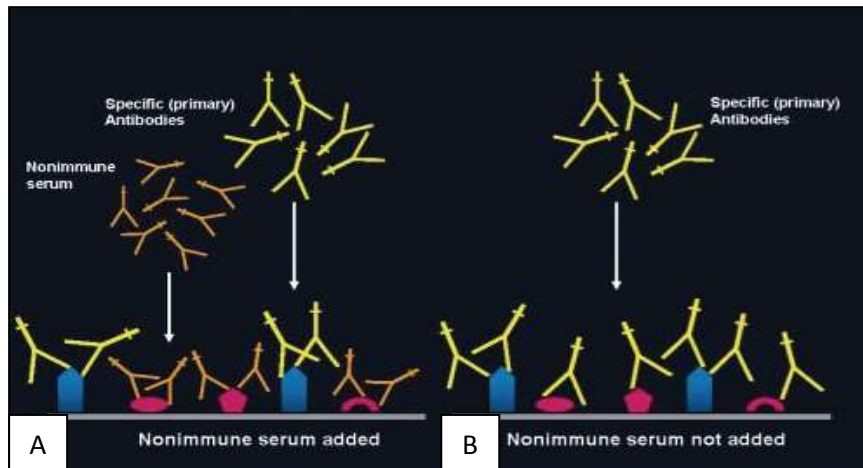


Figura 22. Bloqueio de fundo não específico através de soro normal.
A) O soro normal adicionado antes do Ac primário irá bloquear as ligações não específicas do anti-soro primário. B) Quando não ocorre bloqueio, o Ac primário pode vincular Ag não relacionados (as peças azuis são os antígenos alvo do Ac primário) presentes nos tecidos, causando fundo inespecífico (Adaptado de Ramos-Vara, 2005).

3.6.4.2.5. INTERAÇÕES IÔNICAS E ELETROSTÁTICAS

As interações iônicas são uma das principais forças que controlam a ligação Ag-Ac, podendo também contribuir para o aparecimento de fundo inespecífico. O ponto isoelétrico (pI) da maioria dos anticorpos varia de 5,8 a 8,5. No valor de pH vulgarmente utilizado para os tampões de diluição, os anticorpos podem apresentar redes de cargas superficiais positivas ou negativas, esperando-se a ocorrência de interações iônicas entre as imunoglobulinas (Igs) e as proteínas do tecido, caso estas últimas possuam cargas superficiais opostas. Uma ligação não imune de Igs a tecidos ou a células com carga negativa (por exemplo, endotélio, colagénio) pode ser eficazmente bloqueada por tampões de diluição com elevada capacidade iônica (Boenisch, 2001). Métodos de recuperação antigénica com sulfato de zinco 1%, citrato 0,01M (pH 6,0) ou 0,01M de Tris (pH 9,0), podem resultar em coloração nuclear inespecífica. A causa para a ocorrência desta ligação não específica não está totalmente clarificada, contudo, tem sido levantada a hipótese de um possível envolvimento de uma combinação entre forças eletrostáticas e forças polares (receptor de elétrons/dador de elétrons) (Wieczorek *et al.*, 1997; Boenisch, 2001). A deteção de alguns antígenos é melhorada se a força iônica da solução fixadora for

aumentada (Bruno *et al.*, 1992). A resolução dos problemas associados ao aparecimento de coloração de fundo inespecífico torna-se ainda mais complicada com o facto de que, muitas vezes, esta coloração não específica surge como resultado de uma combinação entre interações iónicas e hidrofóbicas (Boenisch, 2001).

3.6.4.2.6. PIGMENTOS

Tecidos com abundante presença de melanina ou de pigmento ferroso, como a hemosiderina, podem reduzir a relação “sinal-ruído” de reações imunohistoquímicas. Se o pigmento se encontrar presente na mesma célula em que será observado o antígeno a detetar, então a interpretação de resultados pode tornar-se uma tarefa impossível. Como alternativa, pode ser utilizado um sistema de detecção que dê origem a um precipitado de cor diferente. Outra possibilidade é a utilização de permanganato de potássio como forma de bloquear a melanina, contudo, este método pode danificar determinados epítomos (Elias, 2003). Uma alternativa a este tratamento é o recurso a corantes como Giemsa ou Azure B como meios de contracoloração, após a imunoreação ter ocorrido. Com estes corantes, a melanina evidenciar-se-á sob a forma de um produto de cor verde ou azul-verdeado, enquanto que a DAB permanecerá de tonalidade castanha (Kamino & Tam, 1991). Para o caso da hemosiderina, uma solução de 1% de ditionito em tampão de acetato pH 5,0, durante 5 minutos, elimina completamente a hemosiderina, diminuindo igualmente a marcação de fundo (Elias, 2003).

Avaliando todos os aspetos anteriormente referidos, resta concluir que se torna importante reconhecer que o sucesso de uma reação imunohistoquímica não se resume unicamente a uma questão de tecnologia de marcação. O ponto crucial de um método imunológico reside na antigenicidade que foi preservada e tornada acessível numa secção de tecido ou numa preparação celular. O resultado final de um ensaio imunohistoquímico encontra-se, portanto, altamente dependente do manuseamento da amostra e, qualquer que seja o método escolhido, este deve tornar-se necessariamente um compromisso. Seria bastante irrealista esperar que um procedimento padrão pudesse simultaneamente imobilizar todos os tipos

antigénicos, preservar adequadamente a sua antigenicidade, promover uma ótima ligação ao anticorpo correspondente, preservando ainda a integridade estrutural de células e tecidos a nível microscópico (Brandtzaeg *et al.*, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS RECOLHIDAS

Foram utilizadas amostras de tecidos intestinais e renais, recolhidas de porcos submetidos a um processo de hemodiluição normovolémica aguda, sob anestesia geral, para deteção de eventos apoptóticos.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O material biológico utilizado nos métodos imunohistoquímicos foi submetido a uma série de procedimentos técnicos que se iniciaram com a fixação, por um período máximo de 48 horas, em formol tamponado a 10%. Este processo de fixação permitiu a imobilização, de forma estável e permanente, das estruturas celulares e tecidulares, impedindo assim a sua degradação e putrefação.

Após este período, foi efetuado o corte do material em secções de menor dimensão, sendo simultaneamente realizada uma avaliação macroscópica das peças. De seguida, as secções obtidas foram transferidas para um processador de tecidos (Microm STP 120) onde foram sujeitas a um processo de desidratação, através de passagens sucessivas em álcoois de concentrações crescentes (70% I e II, 96% I e II, 100% I e II). Este passo teve como principal objetivo a extração de água dos tecidos, visto esta não ser miscível com os agentes penetradores das substâncias de inclusão (parafina). Ainda no processador de tecidos, procedeu-se ao clareamento ou diafanização em banho de xilol, com vista à remoção do agente de desidratação. Este solvente orgânico, para além de ser solúvel em álcool, é também capaz de dissolver a parafina. Após o banho de xilol, o material tornou-se translúcido e preparado para a impregnação em parafina, fundida a uma temperatura aproximada de 60°C. A parafina substituiu o xilol, ocupando os espaços deixados livres pela água durante o processo de desidratação.

Terminado este processo, as amostras foram retiradas do processador e colocadas numa bancada de inclusão (Microm AP280), prontas para o seu

envolvimento em parafina. Este procedimento consistiu na obtenção, através de um molde metálico de suporte, de um bloco paralelepípedo de parafina solidificada, no qual o material biológico foi incluído.

Após arrefecimento e solidificação, procedeu-se ao corte dos blocos parafinados num micrótomo (Leica RM2255), obtendo-se secções histológicas com 3 µm de espessura. Estas foram transferidas para lâminas adesivadas/silanizadas e colocadas em estufa a uma temperatura de 42°C, onde permaneceram de um dia para o outro, de modo a permitir uma secagem eficaz.

Após secagem das secções histológicas, procedeu-se à passagem em banho de xilol por 15 minutos (desparafinação), seguindo-se um processo de hidratação, através de imersão em banhos sucessivos de álcoois de concentrações decrescentes (100% por 10 minutos, 96%, 80% e 70%, por 5 minutos cada).

O passo seguinte constituiu um modelo de inibição da peroxidase endógena, no qual as amostras foram submetidas a tratamento com H₂O₂ a 3% em metanol, por um período de 30 minutos a temperatura ambiente, sob agitação contínua. Seguidamente, foram realizadas três lavagens em solução tampão TBS (Tris-Buffered Saline, pH 7.4), após o que se procedeu ao tratamento de recuperação antigénica.

4.2.2. IMUNOHISTOQUÍMICA

4.2.2.1. TUNEL

A deteção da apoptose baseada na capacidade enzimática da deoxinucleotidil transferase terminal (TdT) para catalizar um modelo independente de adição de nucleótidos de trifosfato às extremidades 3'-OH da cadeia de DNA fragmentada foi realizada através do Kit *In Situ* Cell Death Detection, POD (Cat. No. 11684817910, Roche, Mannheim, Germany), segundo protocolo recomendado pelo fabricante.

De acordo com a ficha técnica do produto, várias opções relativas ao método de recuperação antigénica se encontravam descritas. No nosso trabalho, duas das possibilidades recomendadas foram testadas, nomeadamente o tratamento enzimático com proteínase K e o tratamento em microondas com solução de tampão

citrato pH 6.0. Esta última opção foi escolhida como tratamento de eleição pois revelou melhores resultados, comparativamente ao método alternativo. Neste procedimento, as lâminas foram submetidas a dois ciclos de radiação de 800 watts, por dois períodos de 5 minutos cada, com arrefecimento intercalar e posterior. Para evitar a secagem das lâminas durante este processo, foi adicionada, entre cada ciclo, uma pequena quantidade de água destilada. Seguiram-se três lavagens em solução tampão TBS, após o que se efetuou a secagem da área em redor da amostra, delimitando o tecido com uma barreira hidrofóbica, de forma a evitar o extravasamento da solução a aplicar posteriormente.

A mistura TUNEL foi realizada segundo diretrizes indicadas pelo fabricante, tendo sido obtida por intermédio da adição da *Label Solution* e da solução enzimática *Enzyme Solution*, componentes do kit, nas quantidades recomendadas, tendo sido posteriormente aferida a melhor diluição para esta mistura enzimática, a qual resultou na titulação de 1:2,5. As lâminas foram incubadas com 100µl de solução enzimática (TdT), em câmara húmida horizontal, por um período de 1 hora a 37°C. A etapa de incubação com a mistura TdT foi omitida no caso do controlo negativo, tendo este sido apenas sujeito a tratamento com *Label Solution*. Para o controlo positivo foi utilizado tecido proveniente de timo de cão, sujeito a tratamento prévio com DNase I recombinant grade I (3000-3 U/mL, Roche, Mannheim, Germany) por cerca de 10 minutos (de forma a induzir quebras de DNA), tendo a reação sido interrompida através da lavagem em solução tampão. As condições de incubação da mistura enzimática TdT utilizadas no caso do controlo positivo foram semelhantes às descritas anteriormente (37°C por 1 hora).

Posteriormente, as preparações foram sujeitas a três lavagens em solução tampão (5 minutos cada). Para observação em microscopia de luz de uma reação de imunoperoxidase, foi necessário proceder à conversão do sinal fluorescente obtido. Para tal, foram adicionados 100µl de solução Converter-POD (anti-fluorescein antibody, Fab fragment from sheep), conjugado com *horseradish peroxidase*, seguindo as instruções indicadas pelo fabricante. Esta incubação foi realizada por um período de 30 minutos a uma temperatura de 37°C, em atmosfera húmida, seguindo-se três lavagens sucessivas em solução tampão, por 5 minutos cada.

A revelação das lâminas foi efetuada através da aplicação do substrato DAB, por um período de 5 minutos, a temperatura ambiente. A reação foi interrompida

através da lavagem em solução tampão, tendo sido posteriormente aplicada lavagem abundante em água tépida.

Procedeu-se à coloração nuclear de contraste com hematoxilina de Harris, por um período de 5 minutos, a temperatura ambiente, seguida de lavagem em água corrente durante 10 minutos.

Para terminar, foi efetuada a desidratação das lâminas, em banhos de álcool de concentração crescente (2 banhos de álcool a 96%, seguidos de 2 banhos de álcool a 100%, por períodos de 5 minutos cada), finalizando todo o processo através da imersão em banho de xilol (5 minutos) e posterior montagem das lâminas com Entellan.

A reação TUNEL foi avaliada através da observação em microscópio Zeiss, modelo Axioplan2 e a captura de imagens foi obtida através de câmara digital Olympus, modelo C5060 Zoom, em objetivas de ampliação 20x e 40x.

4.2.2.2. CITOCROMO C

A deteção do citocromo c citosólico foi avaliada por imunohistoquímica pelo método indireto Avidina-Biotina, através do complexo estreptavidina-biotina (ImmunoCruzTM goat LSAB Staining System: sc-2053). Neste método foi utilizado um anticorpo primário, anticorpo policlonal de cabra *Cytochrome c (C20): sc-8385* (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), aplicado contra o antigénio pretendido. De seguida, introduziu-se um anticorpo secundário biotilado, dirigido contra o anticorpo primário e, posteriormente, foi aplicada estreptavidina marcada com peroxidase, uma enzima que permite a visualização.

O tratamento de recuperação antigénica foi executado em microondas, com solução de tampão citrato pH 6.0. Foram realizados três ciclos de 5 minutos, a uma radiação de 850 watts, intervalados com arrefecimento breve. Sempre que se verificou ebulição e evaporação de solução de tampão citrato, foi adicionada, entre cada ciclo, uma pequena quantidade de água destilada, de modo a evitar a secagem das lâminas. Finalizados os três ciclos de radiação, as preparações foram deixadas a arrefecer em local fresco, por um período de cerca de 25 minutos, após o que se realizaram três lavagens em solução tampão TBS (Tris-Buffered Saline, pH 7.4).

As preparações foram colocadas em câmara húmida vertical, tendo-lhes sido aplicadas 2 gotas da solução de bloqueio de soro, por um período de 10 minutos. Este procedimento antecedeu a incubação do anticorpo primário (*Cytochrome c* (C20): sc-8385), a qual foi realizada numa diluição de 1:1500, *overnight*, a temperatura ambiente. A diluição foi efetuada com recurso à solução diluidora de anticorpos (Antibody Diluent, Zytomed).

Posteriormente, foram efetuadas três lavagens em solução tampão TBS, por 5 minutos cada, seguindo-se a incubação do anticorpo secundário biotilado por um período de 30 minutos, a temperatura ambiente.

A remoção do anticorpo secundário foi feita através de três lavagens sucessivas com solução tampão TBS, por 5 minutos cada, após o que sucedeu a incubação do complexo enzimático estreptavidina-biotina, por um período de 10 minutos. Seguiram-se novamente três lavagens em solução TBS, por 5 minutos cada.

A revelação foi efetuada com o substrato DAB durante 5 minutos, a temperatura ambiente, tendo a reação sido interrompida através da imersão em solução tampão e posterior lavagem abundante em água tépida.

De seguida, foi efetuada coloração de contraste através da hematoxilina de Harris, por um período de 5 minutos, a temperatura ambiente, seguida de lavagem em água corrente durante 10 minutos.

Por último, foi efetuado o processo de desidratação das lâminas, em banhos de álcool de concentração crescente (2 banhos de álcool a 96% seguidos de 2 banhos de álcool a 100%, por períodos de 5 minutos cada), finalizando através da imersão em banho de xilol (5 minutos). A montagem das preparações entre lâmina/lamela foi realizada com Entellan.

Neste procedimento imunohistoquímico foi utilizado como controlo positivo tecido proveniente de timo de coelho, sujeito a condições experimentais idênticas às descritas anteriormente. No caso do controlo negativo, foi omitida a incubação do anticorpo primário, tendo apenas sido aplicada solução diluidora.

A reação final foi avaliada através da observação em microscópio Zeiss, modelo Axioplan2 e a captura de imagens foi obtida através de câmara microscópica digital Leica DFC450 e repetivo software LAS Advanced Analysis Bundle, em objetivas de ampliação 20x e 40x.

5. RESULTADOS

A análise descritiva da expressão dos diferentes marcadores foi realizada de acordo com o critério de cruzes proposto por Sannino e Shousha (1994). Foram avaliados 10 campos de maior ampliação, por preparação, para estabelecer a intensidade de coloração e o número de células marcadas. Relativamente à intensidade de marcação, esta foi classificada em débil (+), moderada (++), intensa (+++) e muito intensa (++++), tendo sido considerados negativos todos os casos em que não se observaram células marcadas.

5.1. AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PELO MÉTODO TUNEL

5.1.1. INTESTINO

A implementação do método TUNEL demonstrou imunoreação positiva nas células epiteliais das vilosidades intestinais, com marcação nuclear classificada de débil a muito intensa (Figuras 23 a 26). Na mucosa, o epitélio das criptas, as glândulas e a lâmina própria não revelaram marcação, assim como as restantes camadas do intestino (submucosa, muscular, serosa), com exceção dos casos de marcação muito intensa ao nível do epitélio, coincidentes com perda de mucosa, em que, na camada mais superficial da lâmina própria, algumas células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) surgem também marcadas (Fig. 25 A; Fig. 26 A e B).

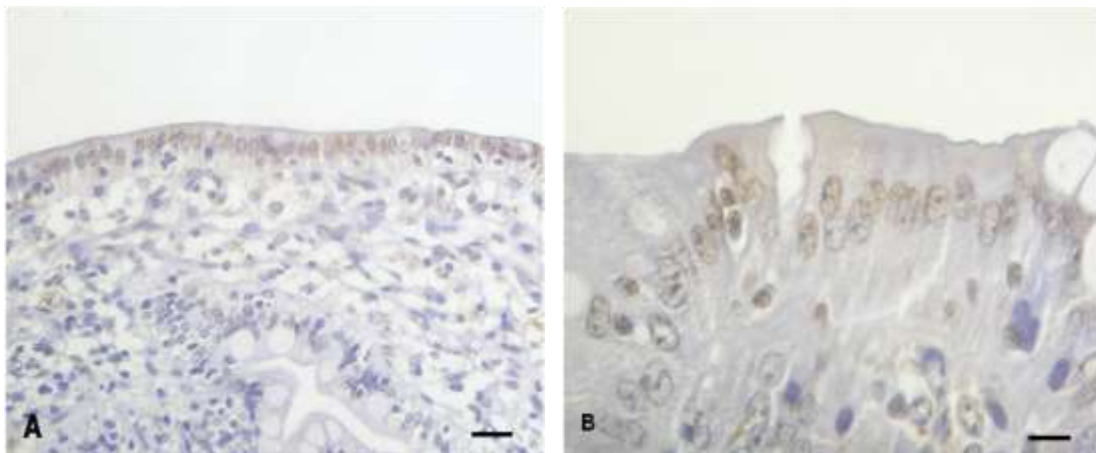


Figura 23. Reação positiva débil (+) em 75-100% das células epiteliais das vilosidades intestinais. TUNEL. A) Bar = 50µm; B) Bar = 25µm.

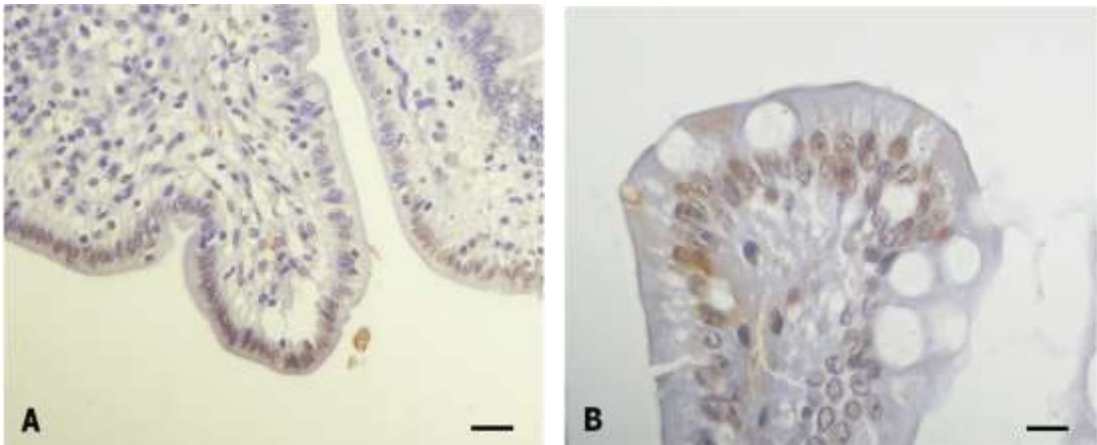


Figura 24. Reação positiva moderada (++) em 75-100% das células epiteliais das vilosidades intestinais. TUNEL. A) Bar = 50 μ m; B) Bar = 25 μ m.

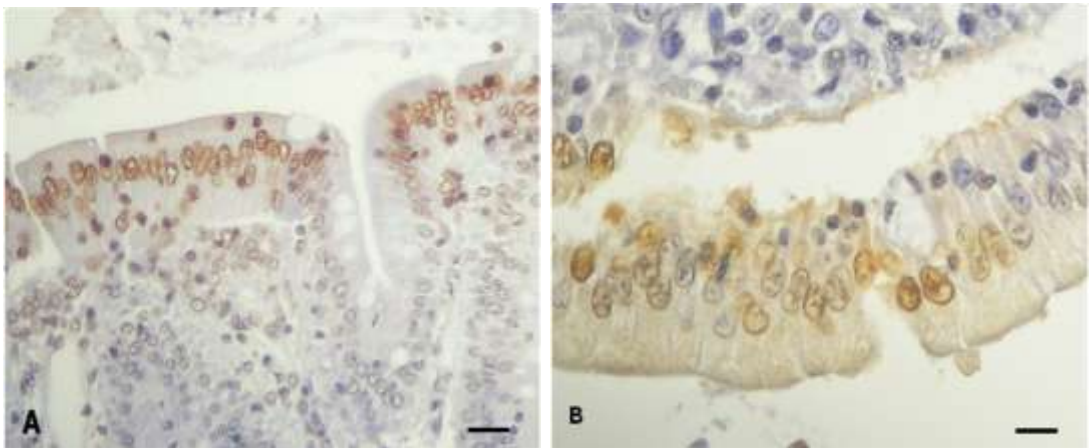


Figura 25. Reação positiva intensa (+++) em A) 75-100% e B) 0-25% das células epiteliais das vilosidades intestinais. TUNEL. A) Bar = 50 μ m; B) Bar = 25 μ m.

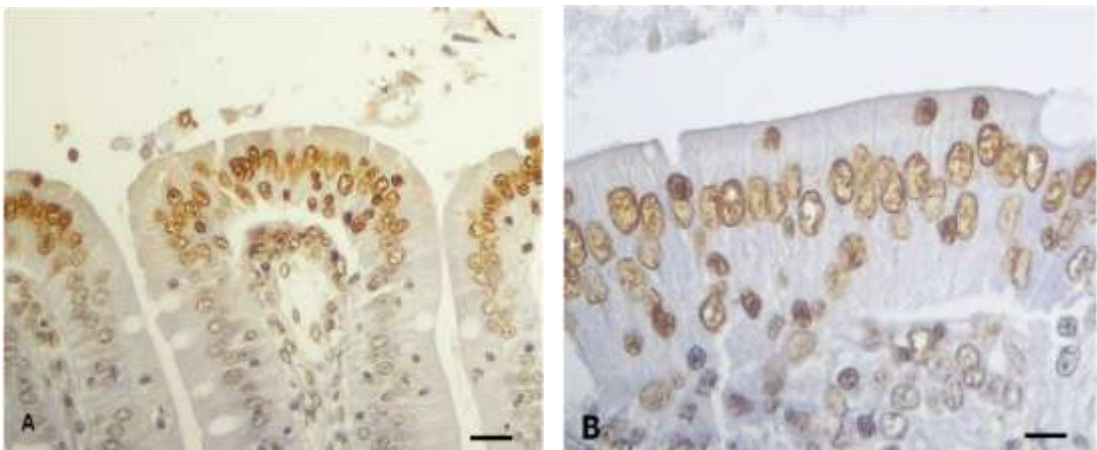


Figura 26. Reação positiva muito intensa (++++), em 0-25% das células epiteliais das vilosidades intestinais. TUNEL. A) Bar = 50 μ m; B) Bar = 25 μ m.

5.1.1. RIM

No rim, a aplicação do método TUNEL demonstrou imunoreação positiva em várias estruturas, nomeadamente no epitélio dos tubulos contornados proximais e distais, no epitélio da ansa de Henlé, no epitélio dos tubulos coletores, no epitélio do folheto parietal da cápsula de Bowman do glomérulo (no caso de rins com muita marcação positiva), bem como nas células podocitárias do glomérulo (no caso de rins com muita marcação positiva), no epitélio de transição da pélvis renal, bem como nas células musculares da pélvis renal. A reação foi classificada de débil (+) a muito intensa (++++), (Figuras 27 a 29).

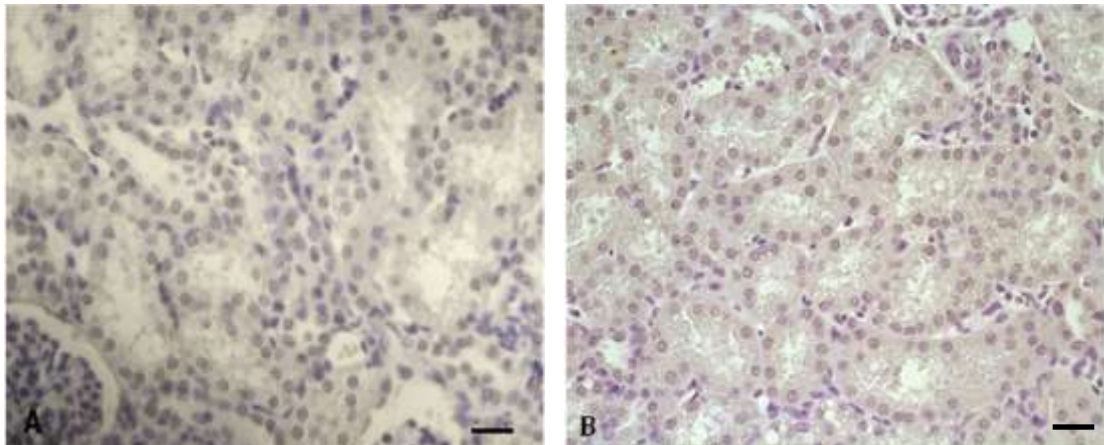


Figura 27. Tubulos contornados proximais do rim com A) imunoreação positiva débil (+) em 75-100% das células epiteliais e B) imunoreação positiva moderada (++) em 75-100% das células epiteliais. TUNEL. Bar = 25µm.

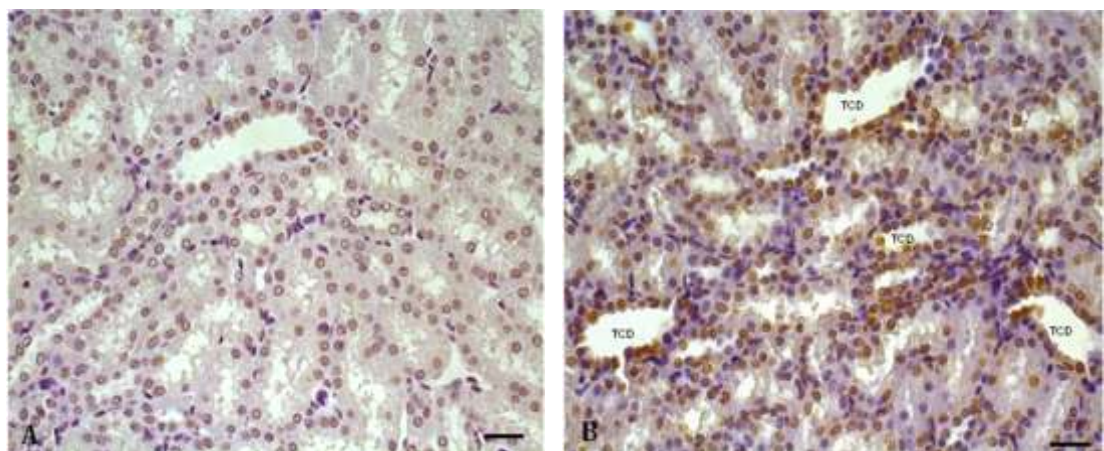


Figura 28. Tubulos contornados proximais do rim com A) imunoreação positiva intensa (+++) em 75-100% das células epiteliais e B) Tubulos contornados distais do rim com imunoreação positiva muito intensa (++++), em 75-100% das células epiteliais. TUNEL. Bar = 25µm.

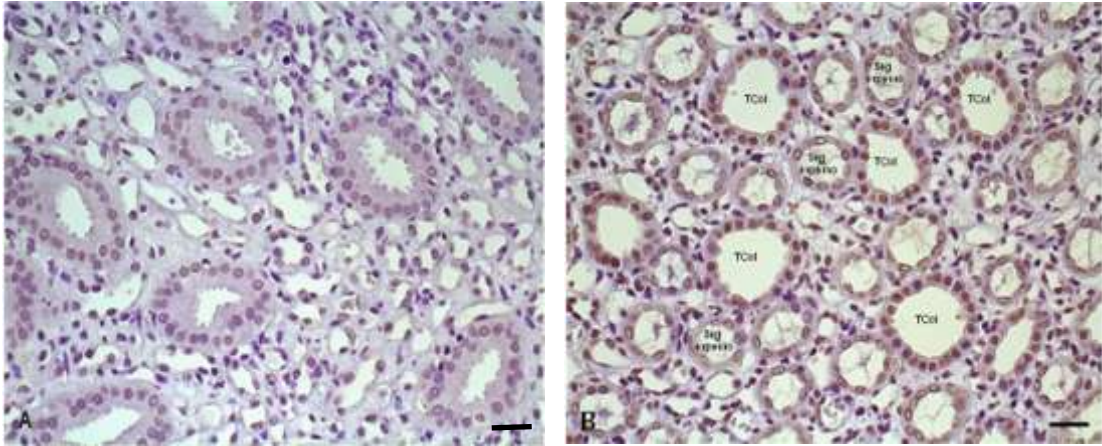


Figura 29. Imunoreação positiva moderada (++) em A) 75-100% das células epiteliais dos tubulos coletores e B) imunoreação positiva muito intensa (++++) em 75-100% das células epiteliais dos tubulos coletores, intensa (+++) nas células epiteliais do segmento espesso da ansa de Henlé. TUNEL. Bar = 25µm.

5.2. AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PELO CITOCROMO C

5.2.1. INTESTINO

Ao nível da camada mucosa, observou-se marcação citoplasmática granular para o citocromo c no citoplasma das células epiteliais das vilosidades intestinais, assim como no epitélio das criptas, no epitélio das glândulas tubulares da lâmina própria e em alguns linfoblastos do tecido linfóide. Na camada submucosa, as células dos gânglios nervosos, assim como as células epiteliais das glândulas mucosas demonstraram reatividade. As restantes camadas do intestino (muscular e serosa) não demonstraram imunoreação para o citocromo c. Nos casos positivos, a marcação foi classificada de moderada (+++) a intensa (+++) (Figuras 30 a 33).

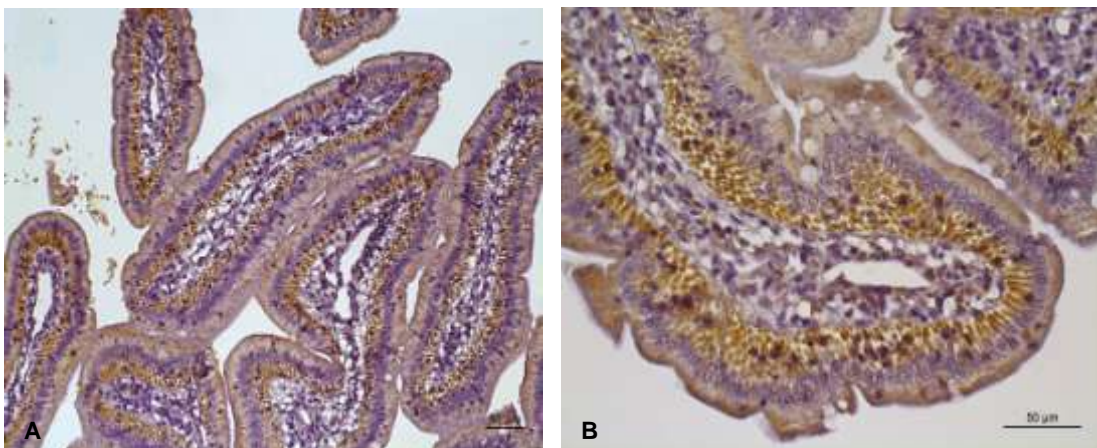


Figura 30. A) e B) Reação positiva muito intensa (++++) em 100% das células epiteliais das vilosidades intestinais. Citocromo C.

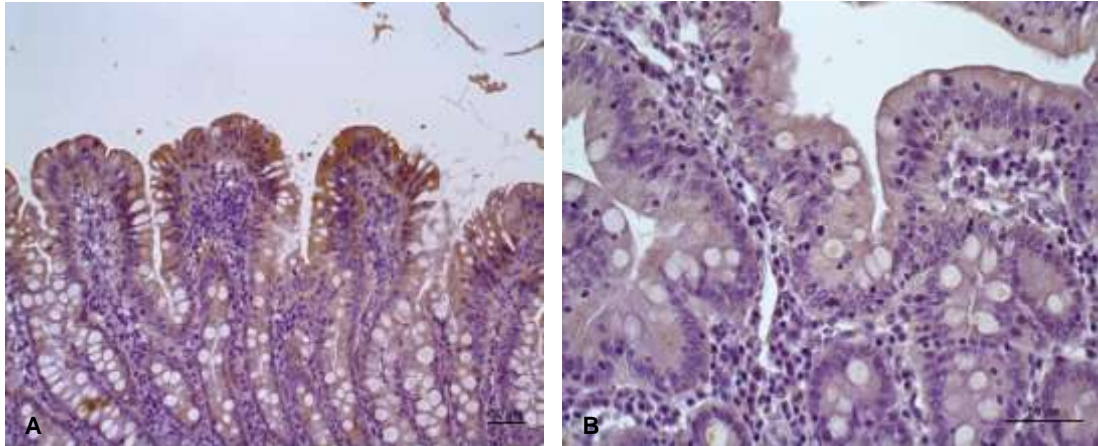


Figura 31. A) e B) Reação positiva moderada (++) em 100% das células epiteliais das criptas intestinais. Citocromo C.

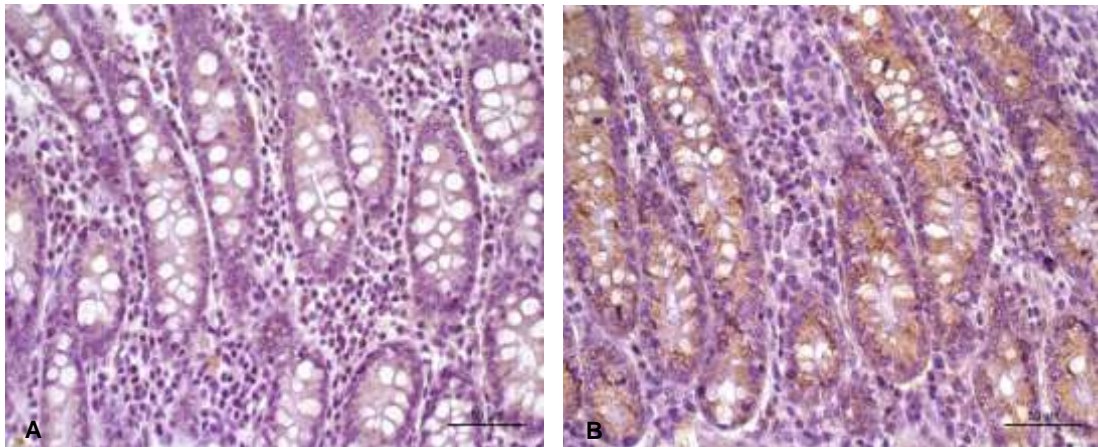


Figura 32. Reação positiva A) moderada (++) e B) intensa (+++) em 100% das células glandulares da mucosa. Citocromo C.

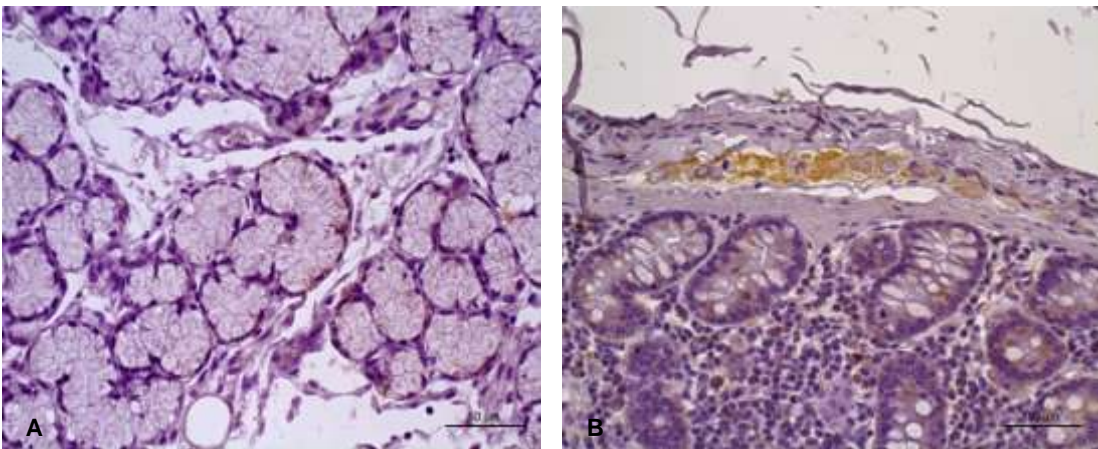


Figura 33. Reação positiva moderada (++) em A) 25-50% das células epiteliais das glândulas mucosas e B) em 100% das células dos gânglios nervosos da submucosa. Citocromo C.

5.2.2. RIM

No rim, foi observada marcação citoplasmática granular no epitélio dos tubulos contornados proximais e distais, no epitélio dos segmentos espessos da ansa de Henlé, em algumas células do epitélio dos ductos coletores, bem como nas células musculares da pélvis renal. Não foi observada marcação glomerular. Quando positiva, a reação foi classificada de débil a (+) a muito intensa (++++) (Figuras 34 a 36).

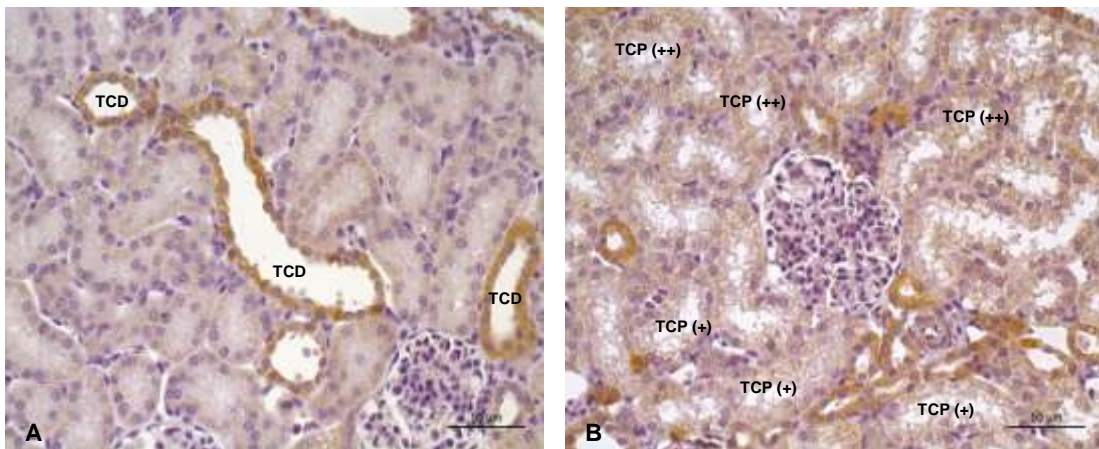


Figura 34. Reação positiva A) muito intensa (++++) em 75-100% das células epiteliais dos tubulos contornados distais e B) moderada (++) em 75-100% das células epiteliais dos tubulos contornados proximais. Citocromo C.

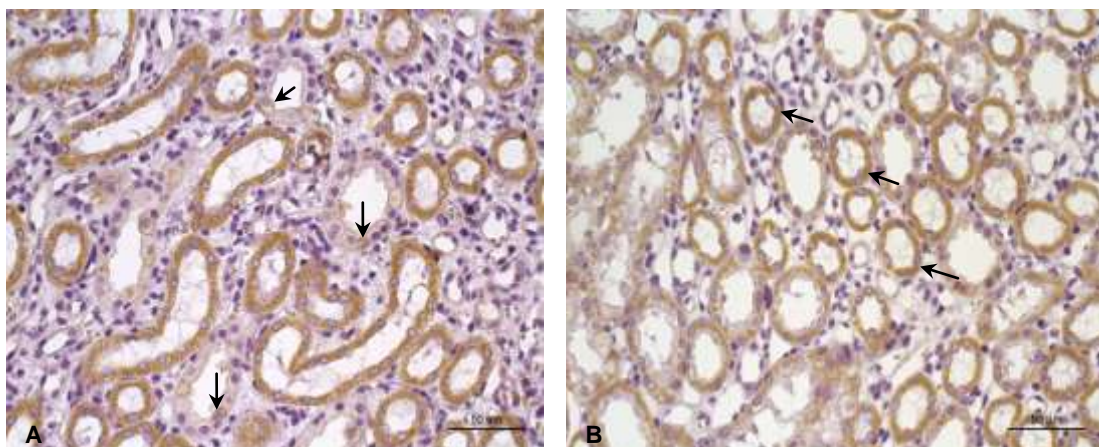


Figura 35. Reação positiva A) moderada (++) nas células epiteliais dos tubulos coletores do rim (inferior a 25% das células) e B) reação positiva muito intensa (++++) em 100% das células epiteliais do segmento espesso da ansa de Henlé. Citocromo C.

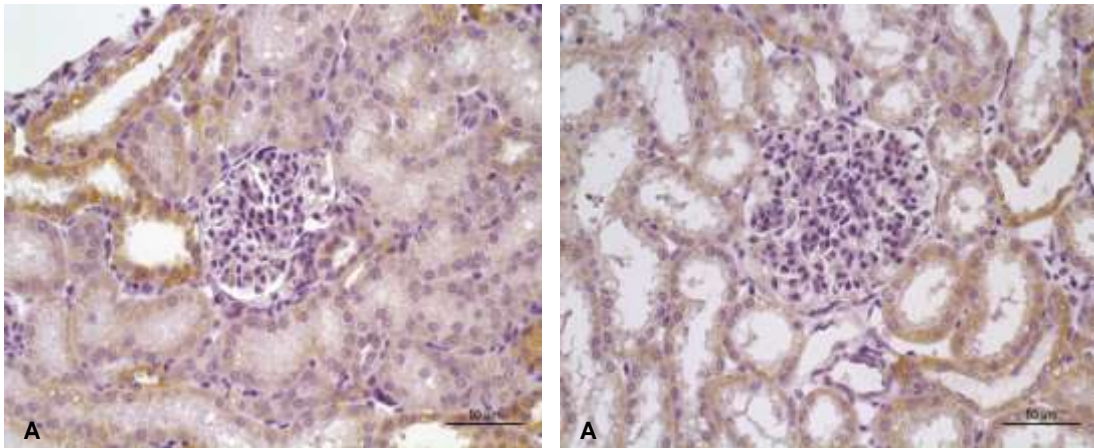


Figura 36. A) e B) Reação negativa nos glomérulos. Citocromo C.

A avaliação sumária da expressão dos marcadores TUNEL e Citocromo C nas diferentes localizações, encontra-se descrita no quadro abaixo.

Quadro 3. Localização da expressão dos marcadores TUNEL e Citocromo c

		TUNEL	CITOCROMO C
MUCOSA			
INTESTINO	Células epiteliais da ponta das vilosidades	+ a +++++	++++
	Epitélio das criptas	-	++
	Glândulas intestinais	-	++ a +++
RIM	Células epiteliais dos tubulos contornados proximais e distais	++ a +++++	+ a +++++
	Células epiteliais dos tubulos coletores	++	++ ^(*)
	Células glomerulares	- (**)	-
	Células epiteliais da ansa de Henlé	segmento fino +++ segmento espesso +++	segmento fino - segmento espesso +++

(*) marcação inferior a 25% das células; (**) negativo com raras exceções

6. DISCUSSÃO

Os métodos imunohistoquímicos representam atualmente uma importante ferramenta no campo da investigação científica, uma vez que permitem a deteção de antígenos pelos respetivos anticorpos, amplificando e tornando visível esta imunoreação. Contudo, vários estudos demonstram que o processo de fixação por intermédio de fixadores aldeídos, comumente utilizados na rotina histopatológica, constitui o maior inconveniente desta técnica, favorecendo a formação de ligações cruzadas que mascaram os antígenos presentes nos tecidos. Para desmascarar alguns epítomos (área da molécula de antígeno que se liga aos anticorpos), torna-se necessária a aplicação de diferentes métodos de recuperação antigénica.

No presente estudo foi utilizado um painel de dois anticorpos como forma de verificar a viabilidade da técnica imunohistoquímica na deteção e quantificação da apoptose a nível celular, tendo por base a avaliação de diferentes parâmetros, tais como as quebras da cadeia de DNA e a libertação de citocromo c para o citosol.

Relativamente à técnica TUNEL, apesar da sua aparente simplicidade de execução, a mesma revelou consideráveis limitações ao nível da sensibilidade e especificidade demonstradas. Segundo Gorczyca *et al.* (2003), a falta de especificidade deste método deriva do facto da enzima deoxinucleotidil transferase terminal reconhecer todos os grupos terminais 3'-OH, independentemente da sua origem, resultando em reações inespecíficas. Os resultados obtidos no presente trabalho experimental corroboram estas limitações, uma vez que, em alguns casos, a elevada coloração de fundo/excesso de sinal e as marcações inespecíficas, constituíram os principais obstáculos. Como forma de otimizar resultados, diferentes tratamentos de recuperação enzimática foram testados (microondas e proteínase K), várias diluições de solução enzimática foram ensaiadas e vários tempos de incubação foram experimentados. Decorridos vários testes experimentais, foi decidida a eliminação do tratamento enzimático pela proteínase K, uma vez que não nos seria possível cumprir as exigências do método, nomeadamente ao nível das pesagens microanalíticas. Não obstante, segundo estudos realizados por Labat-Moleur *et al.* (1998), a utilização deste tratamento revelou bons resultados, com imunoreação em cerca de 70% de células marcadas. De acordo com os mesmos autores, a combinação dos dois tratamentos (incubação na solução de tampão

citrato pH=3 em microondas, seguida de digestão com proteínase K) revelou um incremento na sensibilidade do método, aumentando para cerca de 80% o número de células marcadas. Apesar dos resultados se revelarem bastante satisfatórios, os autores conjugaram ainda os tratamentos anteriores com a incubação em solução de Triton, tendo sido esta a metodologia que consideram como a mais eficaz na detecção de células apoptóticas em tecidos fixados em formol. Para eles, a grande conclusão é a de que a procura de melhores resultados não consiste em reforçar os métodos de recuperação mas sim numa cuidada adaptação qualitativa dos mesmos.

Definido o tratamento de recuperação antigénica que melhor se adaptou à nossa situação, foi necessário aferir as diluições das várias soluções de trabalho e os respetivos períodos de incubação. Sem grande informação técnica de suporte quanto a esta questão, as pesquisas efectuadas, o contacto exaustivo e personalizado com o departamento técnico da empresa Roche Diagnostics, assim como os vários testes realizados, permitiram alcançar a melhor concentração para a solução de trabalho e os tempos de incubação ideais para diminuição dos casos de excesso de sinal, decorrentes de marcações inespecíficas. Esta standardização do método, só conseguida após vários ensaios experimentais, aos quais se encontra associado o elevado custo dos reagentes utilizados e a limitada quantidade de amostras que permitem testar (ex. Kit *In situ* Cell Death Detection), permitiu aferir procedimentos e otimizar resultados.

Os resultados obtidos no intestino vão de encontro ao descrito por vários autores, confirmando-se a marcação nuclear no epitélio das vilosidades intestinais e a ausência de imunoreacção ao nível de outras regiões da mucosa, nomeadamente na lâmina própria, glândulas e criptas do intestino. Trabalhos desenvolvidos por Gravieli *et al.* (1992) referem uma distinta marcação nuclear obtida com o método TUNEL, presente na ponta das vilosidades, desaparecendo em células localizadas mais distalmente ao lúmen do intestino. De forma idêntica, Tóth *et al.* (2007) referem imunomarcação na ponta das vilosidades, no entanto, também as células das camadas basais das criptas revelaram positividade, facto não constatado no nosso estudo. Relativamente à intensidade da reacção, Gravieli *et al.* (1992) referem parecer existir um gradiente celular interno, isto é, nas células onde a reacção se revelou menos intensa, a mesma encontrava-se confinada à periferia nuclear, no entanto, à medida que a reacção intensificava, expandia-se também para o centro do

núcleo, resultados que também pudemos comprovar. Segundo a nossa opinião, a diferenças observadas na intensidade de coloração podem ter-se devido ao facto de alguns epítomos antigénicos, localizados na superfície celular, não terem sido eficazmente desmascarados pelos tratamentos de recuperação. Desta forma, menor número de epítomos desmascarados resultará numa coloração mais débil, enquanto que quantos mais locais de ligação livres existirem, maior será a probabilidade do anticorpo estabelecer ligação, promovendo uma reação final mais intensa.

As marcações inespecíficas (falsos positivos), assim como a elevada coloração de fundo obtida numa primeira fase do ensaio (resultados não mostrados neste trabalho), podem ser explicados pela insuficiente diluição da solução enzimática inicialmente utilizada e/ou tratamentos de recuperação inadequados ou, como resultado de fragmentação de DNA não apoptótico, a qual ocorre em numerosos eventos biológicos, sendo que a enzima deoxinucleotidil transferase terminal reconhece todos os grupos terminais 3'-OH, independentemente da sua origem. De igual forma, outros procedimentos podem surgir como possíveis causas para quebras de DNA, tais como a fixação, a incorporação dos tecidos em parafina, o processo de corte e os pré-tratamentos aplicados. Também a atividade endógena da enzima fosfatase alcalina, presente na bordadura em escova das células epiteliais pode reagir com o cromogénio, produzindo um produto de cor idêntica à da reação final anticorpo-antigénio. Todos estes fatores podem explicar a marcação muitas vezes observada em células não apoptóticas, tornando incapaz a diferenciação imunohistoquímica do verdadeiro processo de apoptose. De igual forma, o aparecimento de falsos negativos pode ocorrer em situações em que a clivagem do DNA se encontre ausente ou incompleta ou, em casos em que ocorram desequilíbrios ao nível dos componentes da matriz extracelular que impeçam o acesso da enzima TdT às ligações quebradas de DNA.

De acordo com trabalhos desenvolvidos por Pulkkanen *et al.* (2000) e Thomas *et al.* (1998), no rim, os nossos resultados confirmam a marcação nuclear observada ao nível do epitélio dos tubulos contornados proximais e distais do rim e no epitélio dos tubulos coletores. À semelhança dos resultados encontrados por Pulkkanen *et al.* (2000), o nosso estudo revelou poucas células glomerulares marcadas, enquanto que para Thomas *et al.* (1998), os resultados demonstram um incremento no número de células glomerulares, tubulares e intersticiais marcadas

em rins remanescentes de ratos submetidos a ablação renal. Não foram encontrados dados comparativos relativamente à marcação positiva observada nas restantes estruturas, nomeadamente ao nível do epitélio do folheto parietal da cápsula de Bowman do glomérulo, no epitélio de transição da pélvis renal, bem como nas células musculares da pélvis renal. Relativamente à marcação observada nas células musculares, esta pode dever-se à atividade enzimática da peroxidase endógena presente na mioglobina das células musculares que, ao reagir com o cromogénio, produz um produto final de cor castanha que se torna indistinguível da imunocoloração específica.

Estudos realizados por Gobe e Endre (2003) referem elevados níveis de marcação nuclear em tubulos renais através do método TUNEL, após processo de hemodiluição normovolémica. Segundo os autores, os danos decorrentes deste processo podem manifestar-se em ruturas da cadeia de DNA que podem ou não ser reparadas. As células não reparadas acabam por sofrer apoptose, no entanto, o “DNA reparado” pode tornar-se positivo à marcação TUNEL, sendo que, a contagem destas células como positivas acabará por gerar um impreciso nível de apoptose. Para Pulkkanen *et al.* (2000), é pouco provável a deteção, pelo método TUNEL, de um tão elevado número de células apoptóticas. Se tal se verificasse, seria necessária uma rápida proliferação celular nas áreas correspondentes. Para eles, a causa para a ocorrência de sinais apoptóticos falsos-positivos nas células tubulares permanece desconhecida, no entanto, as quebras de ligação de DNA podem salientar-se em populações celulares com elevada capacidade proliferativa e metabólica, como é o caso das células tubulares do rim, dando origem a contagens apoptóticas sobrestimadas. Referem ainda o facto das células tubulares poderem reter alguma atividade *post mortem* das endonucleases, mesmo após fixação imediata, resultando em quebras de DNA que reagirão positivamente ao TUNEL. Também a atividade da peroxidase endógena, da fosfatase alcalina e da biotina endógena, enzimas presentes em órgãos como o rim, podem reagir com o cromogénio, dando origem a falsos positivos.

Dos resultados obtidos pelo método TUNEL, a reação detetada na lâmina própria do intestino delgado, assim como nas células podocitárias do glomérulo, marcações apenas observadas em preparações que obtiveram reação epitelial muito intensa, poderá tratar-se de marcação inespecífica decorrente de falsos positivos.

No que respeita à avaliação da expressão do citocromo c citosólico, no intestino, os nossos resultados vão de encontro ao descrito por Shucaí *et al.* (2005), observando-se marcação no citoplasma das células epiteliais das vilosidades. Esta marcação epitelial parece estar relacionada com a elevada taxa de renovação característica deste fenotipo celular que, associada a situações de stress estimuladoras de morte celular, maximizam o número de células a entrar em apoptose.

Os mesmos autores referem ainda expressão quase insignificante na lâmina própria e criptas da camada mucosa, no entanto, os nossos resultados revelaram marcação, ainda que moderada, na totalidade das células epiteliais das criptas intestinais. Já na lâmina própria, um baixo número de células revelou marcação (apenas alguns linfoblastos do tecido linfóide), indo de encontro ao descrito pelos autores. O nosso estudo revelou também imunomarcação ao nível das glândulas tubulares da mucosa e das glândulas mucosas da camada submucosa, no entanto, não encontramos estudos que descrevessem e comprovassem estas observações. Contudo, referências fotográficas consultadas no site www.proteinatlas.org, nas quais se verifica uma marcação intensa para o citocromo c ao nível das glândulas intestinais, permitem comprovar os nossos resultados. A forte marcação observada nestas estruturas pode relacionar-se com a grande expressão proteica do citocromo c ao nível das células glandulares do intestino delgado. Os nossos resultados revelaram ainda marcação ao nível células dos gânglios nervosos da camada submucosa, podendo esta evidência encontrar-se relacionada com a expressão proteica do citocromo c no tecido nervoso.

Para avaliação da marcação pelo citocromo c nas amostras renais, não foi encontrada bibliografia que pudesse comprovar os resultados obtidos no presente estudo, no entanto, referências fotográficas consultadas no site www.proteinatlas.org permitem validar a forte marcação por nós observada ao nível dos tubulos renais. A marcação negativa observada ao nível das células glomerulares encontra-se de acordo com algumas das referências fotográficas consultadas, as quais revelaram ausência de marcação para o citocromo c nestas estruturas. No mesmo site, é também possível observar marcação, classificada de moderada, ao nível das células glomerulares, a qual pode estar relacionada com a também moderada expressão desta proteína nessas estruturas. A extensa marcação observada nos tubulos renais

pode ser explicada pelo facto deste órgão possuir elevada capacidade proliferativa e metabólica e também pela alta expressão proteica do citocromo c nas células tubulares, o que, em conjunto com situações de stress celular, pode desencadear numerosos eventos apoptóticos.

Relativamente às diferentes intensidades de marcação observadas, estas podem ter variado com a diferente acessibilidade dos reagentes aos tecidos, encontrando-se associadas ao processo de embebição em parafina, a tratamentos de recuperação antigénica curtos e/ou inadequados e também a processos de fixação prolongada, ainda que no presente caso a fixação das peças não tenha ultrapassado um período de 48 horas.

As diferenças observadas ao nível da percentagem de células marcadas podem estar relacionadas com o fenótipo celular, com a duração e a intensidade dos estímulos apoptóticos sofridos ou, no caso do TUNEL, a quebras de DNA não apoptótico ou reparado, que, marcando de forma positiva, originam contagens apoptóticas sobrestimadas.

A maioria dos tecidos sofre um ininterrupto processo de renovação celular, mantendo constante o número de células, graças ao equilíbrio existente entre a contínua proliferação e a morte celular, caracterizado por um processo ativo de alterações morfológicas e fisiológicas – a apoptose. Contudo, este “*turnover*” celular pode ser salientado sob condições de stress (ex. privação dos seus fatores de crescimento) que estimulam as células a entrar em apoptose, maximizando o número de eventos apoptóticos.

De acordo com a expressão dos marcadores TUNEL e Citocromo c, descrita no Quadro 3, os dois parecem apresentar resultados muito similares no que respeita às populações celulares afetadas pelo processo de morte celular por apoptose. Por este motivo, consideramos que a expressão do Citocromo c, como marcador implicado na ativação da apoptose, assim como a deteção de produtos endonucleossómicos resultantes da clivagem do DNA, método TUNEL, permitiram prever, identificar e avaliar a ocorrência de numerosos eventos apoptóticos.

7. CONCLUSÕES

Os métodos imunohistoquímicos constituem uma opção viável na detecção de eventos apoptóticos, contudo, a escolha dos diferentes marcadores deve ser criteriosamente avaliada, tendo em conta a sincronia do processo e as alterações morfológicas que se pretendem detetar.

A realização de dois ou mais ensaios imunohistoquímicos distintos torna-se importante na validação da ocorrência do verdadeiro processo apoptótico.

A marcação pela enzima TdT (TUNEL) constitui um método imunohistoquímico útil na detecção de células apoptóticas, no entanto, a sua falta de sensibilidade e especificidade torna difícil a interpretação dos resultados.

A detecção de Citocromo c citosólico, como marcador implicado na ativação da apoptose, assim como o método TUNEL, permitiram prever, identificar e avaliar a ocorrência de numerosos eventos apoptóticos.

Não obstante, consideramos que a validação dos resultados obtidos pelos dois marcadores utilizados neste estudo deveria ser acompanhada de um terceiro ensaio, de maior sensibilidade e especificidade.

7. BIBLIOGRAFIA

Adams JC (1992). Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem.* **40**: 1457–1463.

Alison M (1999). Identifying and quantifying apoptosis: a growth industry in the face of death. *J Pathol.* **188**: 117–118.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J (1999). Manual de Imuno-histoquímica da Sociedade Brasileira de Patologia. 1:1-9.

Amarantes-Mendes GP (2003). Apoptose: Programa molecular de morte celular. Einstein. **1**:15-18.

Anónimo (s/d). Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation. Scientific Information: Apoptosis Slide Show (disponível em https://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/index.jsp?id=slide001&fol=scientific_information&pageid=slide030, consultado em 10/12/2012).

Arber DA (2002). Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* **10**:183-186.

Arnold MM, Srivastava S, Fredenburgh J, Stockard CR, Myers RB, Grizzle WE (1996). Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. *Biotech Histochem.* **71**: 224–230.

Atre N, Thomas L, Mistry R, Pathak K, Chiplunkar S (2006). Role of nitric oxide in heat shock protein induced apoptosis of gammadelta T cells. *Int J Cancer.* **119**: 1368–1376.

Austgulen R, Chedwick L, Vogt Isaksen C, Vatten L, Craven C (2002). Trophoblast apoptosis in human placenta at term as detected by expression of a cytokeratin 18 degradation product of caspase. *Arch Pathol Lab Med.* **126**: 1480-1486.

Avrameas S, Uriel J (1966). Method of antigen and antibody labeling with enzymes and its immunodiffusion application. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci.* **262**: 2543-2545.

Banerjee D, Pettit S (1984). Endogenous avidin-binding activity in human lymphoid tissue. *J Clin Pathol.* **37**: 223–225.

Barrett K, Willingham JM, Garvin J, Willingham MC (2001). Advances in Cytochemical Methods for Detection of Apoptosis. *J Histochem Cytochem.* **49**: 821-832.

Battifora H, Kopinski M (1986). The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. *J Histochem Cytochem.* **34**: 1095-1100.

Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z (1999). Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry.* **35**: 181-195.

Bendayan M (1995). Possibilities of false immunocytochemical results generated by the use of monoclonal antibodies: the example of the anti-proinsulin antibody. *J Histochem Cytochem.* **43**: 881–886.

Boatright KM, Salvensen GS (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* **15**: 725-731.

Bodey B (2002). The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Expert Opin Biol Ther.* **2**: 371–93.

Boenisch T (2001). Formalin-fixed and heat-retrieved tissue antigens: a comparison of their immunoreactivity in experimental antibody diluents. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* **9**: 176–179.

Boenisch T (2009). Antibodies. In Kumar GL, Rudbeck L (Eds). Immunohistochemical Staining Methods, Education Guide (5ª Edição). DAKO, North America, Carpinteria, California, USA:1-9 (disponível em http://www.dako.com/dist/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf, consultado em 09/11/2012).

Brandtzaeg P (1998). The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. *J Immunol Methods*. **216**: 49-67.

Brandtzaeg P, Halstensen TS, Huitfeldt H, Valnes K (1997). Immunofluorescence and immunoenzyme histochemistry. In Johnstone AP, Turner MW (Eds). *Immunochemistry 2 - A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 71.

Brown DC, Theaker JM, Banks PM, Gatter KC, Mason DY (1987). Cytokeratin expression in smooth muscle and smooth muscle tumours. *Histopathology*. **11**: 477-486.

Bruno S, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z (1992). Effect of ionic strength in immunocytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PCNA, and the protein reacting with Ki-67 antibody. *Cytometry*. **13**: 496–501.

Bussolati G, Gugliotta P (1983). Nonspecific staining of mast cells by avidin–biotin–peroxidase complexes (ABC). *J Histochem Cytochem*. **31**: 1419–1421.

Bussolati G, Gugliotta P, Volante M, Pace M, Papotti M (1997). Retrieved endogenous biotin: a novel marker and a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry. *Histopathology*. **31**: 400–407.

Callus BA, Vaux DL (2007). Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ*. **14**: 73.

Cano G, Milanezi F, Leitaõ D, Ricardo S, Brito MJ, Schmitt FC (2003). Estimation of hormone receptor status in fine-needle aspirates and paraffin-embedded sections from breast cancer using the novel rabbit monoclonal antibodies SP1 and SP2. *Diagn Cytol*. **29**: 207–211.

Caron BL, Banks PM (1979). Acetic acid–formalin postfixation for routine tissue processing. *Lab Invest*. **40**: 244–245.

Carr NJ (2000). M30 expression demonstrates apoptotic cells, correlates with in situ end-labeling, and is associated with Ki-67 expression in large intestinal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med*. **124**: 1768-1772.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. **23**: 2825-2837.

Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MHG, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, Reynolds F, Gerdes J, Rilke F (1993). Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol*. **171**: 83-89.

Caulín C, Salvesen GS, Oshima, RG (1997). Caspase Cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. **6**: 1379-1394.

Chipuk JE, Green DR (2005). Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6**: 268-275.

Chiu PM, Ngan YS, Khoo US, Cheung AN (2001). Apoptotic activity in gestational trophoblastic disease correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 CytoDeath antibody. *Histopathology*. **38**: 243-249.

Chu PG, Chang KL Arber DA, Weiss LM (2000). Immunophenotyping of haemopoietic neoplasms. *Semin Diagnostic Pathol*. **17**: 236-246.

Chu PG, Chang KL Arber DA, Weiss LM (2000). Immunophenotyping of haemopoietic neoplasms. *Semin Diagnostic Pathol*. **17**: 236-256.

Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR (1992). Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol*. **61**: 451–453.

Coons AH, Creech HJ, Jones RN (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescence group. *Proc Soc Exp Biol Med*. **47**: 200-202.

Coons AH, Kaplan MH (1950): Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med*. **91**: 1–13.

Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Masos DY (1984). Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem.* **32**: 219-229.

Cory S, Adams JM (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* **2**: 647.

Cuello-Carrion FD, Ciocca D (1999). Improved detection of apoptotic cells using a modified in situ TUNEL technique. *J Histochem Cytochem.* **47**: 837–839.

Cummings MC, Winterford CM, Walker NI (1997). Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* **21**: 88–101.

Curran RC, Gregory J (1978). Demonstration of immunoglobulins in cryostat and paraffin sections of human tonsil by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques: Effects of processing on immunocytochemical performance of tissues and on the use of proteolytic enzymes to unmask antigens in section. *J Histochem Cytochem.* **31**: 974-983.

D´Amico F, Skarmoutsou E, Stivala F (2009). State of art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J Immunol Methods.* **341**: 1-18.

Danial NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell.* **116**: 205-219.

Darzynkiewicz Z, Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR (1999). Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications. *Exp Cell Res.* **249**: 1-12.

de Matos LL, Machado LN, Sugiyama MM, Bozzetti RM, Pinhal MAS (2005). Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. *Arq Med ABC.* **30** :19–25.

Debatin KM, Krammer PH (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene.* **23**:2950-2966.

Duhamel RC, Johnson DA (1985). Use of nonfat dry milk to block nonspecific nuclear and membrane staining by avidin conjugates. *J Histochem Cytochem.* **33**: 711–714.

Elias JM (1990). *Immunohistopathology: a practical approach to diagnosis* (2nd ed). ASCP Press, Chicago, IL. pp. 1–110.

Elias JM (1991). Positive isn't always everything. *J Histotechnol.* **14**:11.

Elias JM (2003). Immunohistochemical methods. In *Immunohistopathology: a practical approach to diagnosis* (2nd ed). ASCP Press, Chicago, IL. pp. 1–110.

Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati DJ (1989). Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission. *Am J Clin Pathol.* **92**: 836–43.

Elias JM, Margiotta M, Gaborc D (1989). Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin–biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin–biotin (LAB) methods. *Am J Clin Pathol.* **92**: 62–67.

Elmore S (2007). Apoptosis: a Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* **35**: 495-516.

Eltoum I, Fredenburgh J, Grizzle WE (2001). Advanced concepts in fixation:1. Effects of fixation on immunohistochemistry, reversibility of fixation and recovery of proteins, nucleic acids, and other molecules from fixed and processed tissues. 2. Developmental methods of fixation. *J Histotechnol.* **24**: 201-210.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* **1757**: 1371-1387.

Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **10**: 76-100.

Fischer U, Schulze-Osthoff K (2005). New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev.* **57**: 187-215.

Fisher U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **10**: 76-100.

Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP (1985). Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem.* **33**: 845-853.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* **384**: 201-231.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992). Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *The Journal of Cell Biology.* **3**: 493-501.

Gobe GC, Endre ZH (2003). Cell death in toxic nephropathies. *Semin Nephrol.* **23**: 416-424.

Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* **2**: 156-162.

Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by in situ terminal deoxyribonucleotidyl transferase and nick translation assay. *Cancer Res.* **53**: 1945–1951.

Gown AM (2004). Unmasking the mysteries of antigen or epitope retrieval and formalin fixation. *Am J Clin Pathol.* **121**: 172-174.

Gown AM, de Wever N, Battifora H (1993). Microwave-based antigenic unmasking: A revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem.* **1**: 256-266.

Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology.* **21**: 1465–1468.

Grassi A, Susca M, Ferri S, Gabusi E, D'Errico A, Farina G, Maccariello S, Zauli D, Bianchi F, Ballardini G. (2004) Detection of the M30 Neoepitope as a New Tool to Quantify Liver Apoptosis. *Am J Clin Pathol.* **121**: 211-219.

Green DR, Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* **305**: 626-629.

Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science.* **281**: 1309-1312.

Groves DJ, Morris BA (2000). Veterinary sources of non rodent monoclonal antibodies: interspecific and intraspecific hybridomas. *Hybridoma.* **19**: 201–214.

Guerrero A, Arias AM (1998). Apoptosis. In: SPERELAKIS N. Cell Physiology Source Book. San Diego: Academic Press. pp 1031-1054.

Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S (1979). The uses of avidin–biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem.* **27**: 1131–1139.

Gupta, S (2003). Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Inter J Oncol.* **22**: 15-23.

Hann CR, Springett MJ, Johnson DH (2001). Antigen retrieval of basement membrane proteins from archival eye tissues. *J Histochem Cytochem.* **49**: 475-482.

Hasui K, Takatsuka T, Sakamoto R, Su L, Matsushita S (2002). Improvement of supersensitive immunohistochemistry with an autostainer: a simplified catalysed signal amplification system. *Histochem J.* **34**: 215–222.

Hayat MA (2002). Antigens and Antibodies. In: Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy, ed. Hayat MA, Kluwer Academic, New York, NY, pp. 31–51.

Hayat MA (2002). Factors affecting antigen retrieval. In Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy, ed. Hayat MA, Kluwer Academic, New York, NY. pp. 53–69.

Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature.* **407**: 770-776.

Heras A, Roach CM, Key ME (1995). Enhanced polymer detection system for immunohistochemistry. *Lab Invest.* **72**: 165.

Hoetelmans RWM, van Slooten H-J, Keijzer R, van de Velde CJH, van Dierdonck JH (2001). Routine formaldehyde fixation irreversibly reduces immunoreactivity of Bcl-2 in the nuclear compartment of breast cancer cells, but not in the cytoplasm. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* **9**: 74-80.

Hsu S-M, Raine L (1982). Protein A, avidin and biotin in immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem.* **29**: 1349–1353.

Hsu S-M, Raine L, Fanger H (1981). Use of avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* **29**: 577–580.

<http://www.proteinatlas.org>, consultado em 24/05/2013.

Hunt NC, Attanoos R, Jasani B (1996). High temperature antigen retrieval and loss of nuclear morphology: a comparison of microwave and autoclave techniques. *J Clin Pathol.* **49**: 766-770.

Jaffer S, Bleiweiss IJ (2004). Beyond hematoxylin and eosin—the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Invest.* **22**: 445-465.

Jambhekar NA, Chaturvedi AC, Madur BP (2008). Immunohistochemistry in surgical pathology practice: A current perspective of a simple, powerful, yet complex, tool. *Indian J Pathol Microbiol.* **51**: 2-11.

Jasani B, Rhodes A (2001). The role and mechanism of high-temperature antigen retrieval in diagnostic pathology: Mini-symposium: Immunohistochemistry in diagnostic pathology. *Curr Diagnostic Pathol.* **7**: 153-60.

Jennette JC, Wick MR (1998). Immunohistochemical techniques. In *Immunohistology in diagnostic pathology*, Ed Jenette JC, CRC Press. Boca Raton FL. USA. pp 1-29.

Jensen HE, Salonen J, Ekfors TO (1997). The use of immunohistochemistry to improve sensitivity and specificity in the diagnosis of systemic mycoses in patients with haematological malignancies. *J Pathol.* **181**: 100–105.

Jerome KR, Vallan C, Jaggi R (2000). The TUNEL assay in the diagnosis of graft-versus-host disease: caveats for interpretation. *Pathology.* **32**: 186–190.

Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* **189**: 1411-1418.

Jin Z, El-Deiry WS (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy.* **4**: 139-163.

Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH (1984). Improved technique utilizing non-fat dried milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal Tech.* **1**: 3–8.

Joza N, Kroemer G, Penninger JM (2002). Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet.* **18**: 142.

Juhl BR, Nørgaard T, Bjerrum OJ (1984). The effect of Tween 20 on direct immunoperoxidase staining of blood group antigen A in human urothelium. *J Histochem Cytochem.* **32**: 935–941.

Kamino H, Tam ST (1991). Immunoperoxidase technique modified by counterstain with azure B as a diagnostic aid in evaluating heavily pigmented melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol.* **18**: 436–439.

Kelekar A (2005). Autophagy. *Ann NY Acad Sci.* **1066**: 259-271.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **26**: 239-257.

Kim SJ, Hwang SG, Shin DY, Kang SS, Chun JS (2002). p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating

p53 via NF κ B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation. *J Biol Chem.* **277**: 33501–33508.

Kressel M, Groscurth P (1994). Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labeling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.* **278**: 549-556.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* **87**: 99-163.

Kuranaga E, Miura M (2007). Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends Cell Biol.* **17**: 135-144.

Kusama K, Jiang Y, Toguchi M, Ohno J, Shikata H, Sakashita H, Sakagami H (2000). Immunohistochemical detection of cytokeratin 18 and its neo-epitope in human salivary glands and pleomorphic adenomas. *Anticancer Res.* **20**: 2485-2487.

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A (1998). TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem.* **46**: 327–334.

Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell.* **14**: 277-287.

Lee H, Douglas-Jones AG, Morgan JM, Jasani B (2002). The effect of fixation and processing on the sensitivity of oestrogen receptor assay by immunohistochemistry in breast carcinoma. *J Clin Pathol.* **55**: 236-238.

Leers MPG, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Björklund P, Ramaekers FCS, Björklund B, Nap M, Jörnvall H, Schutte B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *Journal of Pathology.* **187**: 567-572.

Leong AS, Gilham PN (1989). The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology.* **21**: 266-268.

Leong AS, Milios J, Leong FJ (1996). Epitope retrieval with microwaves: A comparison of citrate buffer and EDTA with three commercial retrieval solutions. *Appl Immunohistochem*. **4**: 201-207.

Leong AS, Wright J (1987). The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. *Histopathology*. **11**: 1295-1305.

Liguori MJ, Hoff-Velk JA, Ostrow DH (2001). Recombinant human interleukin-6 enhances the Ig secretion of a rabbit-rabbit hybridoma. *Hybridoma*. **20**: 189-198.

Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *Ilar J*. **46**: 258-268.

Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*. **10**: 629-639.

Lucocq JM, Roth J (1985). Colloidal gold and colloidal silver-metallic markers for light microscopic histochemistry In *Immunocytochemistry*, eds. Bullock GR and Petrusz P. Academic Press, New York, NY. pp. 203-236.

Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6**: 439-448.

Marrack J (1934). Nature of Antibodies. *Nature*. **133**: 292-293.

Mason DY, Sammons R (1978). Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labeling of cellular constituents. *J Clin Pathol*. **31**: 454-460.

Mason DY, Sammons R (1978). Rapid preparation of peroxidase anti-peroxidase complexes for immunocytochemical use. *J Immunol Methods*. **20**: 317-324.

Mason TE, Phifer RF, Spicer SS (1969). An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J Histochem Cytochem*. **17**:563-569.

Matos LL, Trufelli DC, Matos MGL, Pinhal MAS (2010). Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarker Insights*. **5**: 9-20.

Meier P, Finch A, Evan G (2000). Apoptosis in development. *Nature*. **407**: 796-801.

Merz H, Malisius R, Mann-Weiler S, Zhou R, Hartmann W, Orscheschek K, Moubayed P, Feller AC (1995). Methods in laboratory investigation ImmunoMax. A maximized immunohistochemical method for the retrieval and enhancement of hidden antigens. *Lab Invest*. **73**: 149–156.

Mighell AJ, Hume WJ, Robinson PA (1998). An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. *Oral Dis*. **4**: 217–223.

Miller MA, Ramos-Vara JA, Kleiboeker SB, Larson RL (2005). Effects of delayed or prolonged fixation on immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus type I in skin of two persistently infected calves. *J Vet Diagn Invest*. **17**: 461-463.

Mitchell RN, Cotran RS (2007). Cell injury, cell death, and adaptations. In Kumar V, Cotran R, Robbins SL (Eds). *Basic Pathology* (8th ed). Elsevier Science, Philadelphia, pp. 19–22.

Mooi WJ, Peeper DS (2006). Oncogene-induced cell senescence-halting on the road to cancer. *N Engl J Med*. **355**: 1037-1046.

Morsi HM, Leers MP, Jager W, et al. (2000) The patterns of expression of an apoptosis-related CK18 neoepitope, the *bcl-2* proto-oncogene, and the Ki67 proliferation marker in normal, hyperplastic, and malignant endometrium. *Int J Gynecol Pathol*. **19**: 118-126.

Mount SL, Cooper K (2001). Mini-symposium: Immunohistochemistry in diagnostic pathology. Beware of biotin: A source of false-positive. *Immunohistochem Curr Diagnostic Pathol*. **7**: 161-167.

Munakata S, Hendricks JB (1993). Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin embedded tissue. *J Histochem Cytochem.* **41**: 1241-1246.

Nadji M (1986). Immunoperoxidase techniques. I. Facts and artifacts. *Am J Dermatopathol.* **8**: 32–6.

Nakane PK (1968). Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem.* **16**: 557-560.

Nakane PK (1968). Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase labeled antibody methods: A study of the pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem.* **16**: 557-560.

Namimatsu S, Ghazizadeh M, Sugisaki Y (2005). Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: a universal antigen retrieval method. *J Histochem Cytochem.* **53**: 3-11.

Naritoku WY, Taylor CR (1982). A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunohistochemical methods: an evaluation of monoclonal and polyclonal antibodies against human prostatic acid phosphatase. *J Histochem Cytochem.* **30**: 253–260.

Nelson PN, Fletcher SM, MacDonald D, Goodall DM, Jefferis R (1991). Assay restriction profiles of three monoclonal antibodies recognizing the G3m(u) allotype: development of an allotype specific assay. *J Immunol Methods.* **138**: 57–64.

Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG (2000). Monoclonal antibodies. *J Clin Pathol Mol Pathol.* **53**: 111–117.

Norton AJ, Jordan S, Yeomans P (1994). Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol.* **173**: 371-379.

Okada H, Mak TW (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* **4**: 592:603.

Omary BO, Ku NO, Liao J, Price D (1998). Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem.* **31**: 105-140.

Otsuky Y, Li Z and Shibata MA (2003). Apoptotic detection methods-from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem.* **38**: 275-339.

Parolin MB, Reason IJM (2001). Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq Gastroenterol.* **38**: 138-144.

Petrosyan K, Tamayo R, Joseph D (2002). Sensitivity of a novel biotin-free detection reagent (Powervision+_) for immunohistochemistry. *J Histotechnol.* **25**: 247–250.

Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, Ascani S, Santini D, Piccaluga PP, Leone O, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L, Falini B (1997). Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol.* **183**: 116-123.

Pino RM (1985). Binding of Fab–horseradish peroxidase conjugates by charge and not by immunospecificity. *J Histochem Cytochem.* **33**: 55–58.

Polak JM, Van Noorden S (2003): Introduction to Immunocytochemistry (3rd ed). Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. pp 176.

Ponder BA, Wilkinson MM (1981). Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* **29**: 981–984.

Poot M, Pierce RH (1999). Detection of changes in mitochondrial function during apoptosis by simultaneous staining with multiple fluorescent dyes and correlated multiparameter flow cytometry. *Cytometry.* **35**: 311-317.

Portiansky E, Gimeno EJ (1996). A new epitope retrieval method for the detection of structural cytokeratins in the bovine prostate tissue. *Appl Immunohistochem.* **4**: 208-214.

Pulkkanen KJ, Laukkaken MO, Naarala J, Yla-Herttuala (2000). False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. *Apoptosis*. **5**: 329-333.

Ramos-Vara JA (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*. **42**: 405-426.

Ramos-Vara JA (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*. **42**: 405-426.

Ranganath RM, Nagashree NR (2001). Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol*. **202**: 159-242.

Rickert RR, Maliniak RM (1989). Intralaboratory quality assurance of immunohistochemical procedures. Recommended practices for daily application. *Arch Pathol Lab Med*. **113**: 673–9.

Riedl SJ, Salvesen GS (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**: 405.

Robertson D, Savage K, Reis-Filho JS, Isacke CM (2008). Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biology*. **9**: 13.

Robinson JP, Sturgis J, Kumar GL (2009). Immunofluorescence. In Kumar GL, Rudbeck L (Eds). *Immunohistochemical Staining Methods, Education Guide* (5ª Edição). DAKO, North America, Carpinteria, California, USA:1-9 (disponível em http://www.dako.com/dist/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf, consultado em 09/11/2012).

Rodney MT (2001). Technical Immunohistochemistry: Achieving reliability and reproducibility of immunostains. *Society for Applied Immunohistochemistry – 2001 Annual Meeting*. New York: 1-56.

Rojo F, Tabernero J, Albanell J, Van Cutsem E, Ohtsu A, Doi T, Koizumi W, Shirao K, Takiuchi H, Ramon y Cajal S, Baselga J (2006). Pharmacodynamic studies of gefitinib in tumor biopsy specimens from patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. **24**: 4309-4316.

Rosai J (1996). Special techniques in surgical pathology. In Ackerman's Surgical Pathology. Nova Iorque, Mosby-Year Book. pp 29–62.

Rudiger T, Hofler H, Kreipe HH (2002). Quality assurance in immunohistochemistry: Results of an interlaboratory trial involving 172 pathologists. *Am J Surg Pathol.* **26**: 873-882.

Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K (2004). Colon cancer: genetics and apoptotic events. *Biol Chem.* **385**: 449-464.

Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA (1998). The EnVision+ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research: critical comparison with the APAAP, ChemMate CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol.* **51**: 506–511.

Sambade, C (2005). A Morte Celular por Apoptose. In *Biologia Celular e Molecular*. Carlos Azevedo (Coord.). 4ª Edição. Lidel – Edições Técnicas. pp 553-573.

Sannino P, Shousha S (1994). Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. *J Clin Pathol.* **47**: 90-92.

Saraste A, Pulkki K (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* **45**: 528-537.

Schmitt FC (1991). Utilidade dos métodos imuno-histoquímicos para o diagnóstico anatomopatológico. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* **46**: 26–30.

Schulze-Osthoff K (2008). How cells die: Apoptosis and other cell death pathways. In Rode H-J (Ed). *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation* (4ª Edição). Roche Diagnostics GmbH, Germany:2-18 (disponível em https://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/docs/Apoptosis_Cytotox_CelProl_4th_edition.pdf, consultado em 10/12/2012);

Schwerk C, Schulze-Osthoff K (2003). Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol.* **66**: 1453-1458.

Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell.* **2**: 55-57.

Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ, Taylor CR (1993). Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *J Histochem Cytochem.* **4**: 1599-1604.

Shi SR, Cote RJ, Taylor CR (1997). Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem.* **45**: 327-343.

Shi SR, Cote RJ, Taylor CR (2001). Antigen retrieval techniques: Current perspectives. *J Histochem Cytochem.* **49**: 931-937.

Shi SR, Guo J, Cote RJ, Young LL, Hawes D, Shi Y, Thu S, Taylor CR (1999). Sensitivity and detection efficiency of a novel two-step detection system (PowerVision) for immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* **7**: 201–208.

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 SR, Key ME, Kalra KL (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffine embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* **39**: 741–748.

Shiozaki EN, Shi Y (2004). Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci.* **29**: 486.

Shucaï A, Yoshitaka H, Takehito K (2005). Induction of cell death in rat small intestine by ischemia reperfusion: differential roles of Fas/Fas ligand and Bcl-2/Bax systems depending upon cell types. *Histochem Cell Biol.* **123**: 249–261.

Speel EJM, Hopman AHN, Komminoth P (1999). Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: Play CARD(S). *J Histochem Cytochem.* **47**: 281–288.

Sternberger LA (1967). Electron microscopic immunocytochemistry: a review. *J Histochem Cytochem.* **15**: 139-159.

Sternberger LA, Hardy Jr PH, Cuculis JJ, Meyer HG (1970). The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem*; **18**: 315-333.

Straus W (1974). Cleavage of heme from horseradish peroxidase by methanol with inhibition of enzyme activity. *J Histochem Cytochem.* **22**: 908–911.

Straus W (1979). Peroxidase procedures: technical problems encountered during their application. *J Histochem Cytochem.* **27**:1349–1351.

Streefkerk JG (1972). Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J Histochem Cytochem.* **20**: 829–831.

Suurmeijer AJH (1992). Microwave-stimulated antigen retrieval. A new method facilitating immunohistochemistry of formalin-fixed, paraffin embedded tissue. *Histochem J.* **24**:597.

Swaab DF (1982). Comments on the validity of immunocytochemical methods. In *Neurology and Neurobiology: Cytochemical Methods in Neuroanatomy*, ed. Chan-Palay V and Palay SL, vol. 1. Alan R Liss, New York, NY. pp. 423–440.

Swanson PE (1991). Heffalumps, Jagulars, and Cheshire Cats. A commentary on cytokeratins and Soft tissue sarcomas. *Am J Clin Pathol.* **95**: S2-7.

Swanson PE (1997). HIERanarchy: the state of the art in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol.* **107**: 139–40.

Tacha DE, McKinney LA (1992). Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques. *J Histotech.* **15**: 127–132.

Taylor CR (1994). An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. *Hum Pathol.* **25**: 2–11.

Taylor CR, Cote RJ (1994). Immunomicroscopy: a diagnostic tool for surgical pathologist. In *Major Problems in Pathology* (2nd ed). WB Saunders. Nova Iorque.

Taylor CR, Shi S-R, Barr NJ, Wu N (2002): Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In *Diagnostic Immunohistochemistry*, ed. Dabbs DJ. Churchill Livingstone, New York, NY. pp. 3–43.

Taylor CR, Shi SR, Chen C, Young L, Yang C, Cote RJ (1996). Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave and pressure cooker, autoclave, and steamer. *Biotech Histochem.* **71**: 263-270.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**: 231-241.

Thomas GL, Yang B, Wagner BE, Savill J, El Nahas AM (1998). Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* **13**: 2216-2226.

Torres LFB (1998). A contribuição da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica: experiência de 10 anos. *Rev Med Paraná.* **56**: 31–38.

Torres LFB, Noronha L, Telles J (1995). A importância da imuno-histoquímica no diagnóstico anatomopatológico em hospital geral: análise de 885 casos. *J Bras Patol Med Lab.* 31p.

Tóth S, Pomfy M, Wohlfahrt P, Pingorová S, Kiss J, Baláz P, Rokosny S, Benacka R, Verselá J (2007). Detection of early stages of apoptosis in experimental intestinal ischemia-reperfusion injury. *Biologia, Bratislava.* **4**: 491-497.

Tsien RY (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* **67**: 509-544.

Van Gijlswijk RPM, Zijlmans HJMAA, Wiegant J, Bobrow MN, Erickson TJ, Adler KE, Tanke HJ, Raap AK (1997). Fluorochrome-labeled tyramines: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem.* **45**: 375–382.

Van Hecke D (2002). Routine immunohistochemical staining today: choices to make, challenges to take. *J Histotechnol.* **25**: 45–54.

Vaux DL, Silke J (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* **304**: 499.

Vyberg M, Nielsen S (1998). Dextran polymer conjugate two step visualization system for immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem.* **6**: 3–10.

Wadsley JJ, Watt RM (1987). The effect of pH on the aggregation of biotinylated antibodies and on the signal-tonoise observed in immunoassays utilizing biotinylated antibodies. *J Immunol Methods.* **103**: 1–7.

Ward JM, Erexson CR, Faucette LJ, Foley JF, Dijkstra C, Cattoretti G (2006). Immunohistochemical markers for the rodent immune system. *Toxicol Pathol.* **34**: 616-630.

Wasielewski R, Komminoth P, Werner M (1998). Influence of fixation, antibody clones, and signal amplification on steroid receptor analysis. *Breast J.* **44**: 33–40.

Watanabe M, Hitomi M, Van der Wee K, Rothenberg F, Fisher SA, Zucker R, Svoboda KK, Goldsmith EC, Heiskanen KM and Nieminen AL (2002). The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues and organs. *Microsc Microanal.* **8**: 375-391.

Weaver BA, Cleveland DW (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation and cell death. *Cancer Cell.* **8**: 7-12.

Webster JD, Miller MA, DuSold D; Ramos-Vara J (2009). Effects of Prolonged Formalin Fixation on Diagnostic Immunohistochemistry in Domestic Animals. *J Histochem Cytochem.* **57**: 753–761.

Weiss LM, Chang KL (1999). Practical applications of immunohistochemistry. Short course handout. United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting.

Wendelboe HG, Bisgaard K (2009). Background. In Kumar GL, Rudbeck L (Eds). Immunohistochemical Staining Methods, Education Guide (5ª Edição). North America, Carpinteria, California, USA:1-9 (disponível em http://www.dako.com/dist/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf), consultado em 09/11/2012).

Werner B, Campos AC, Nadji M, Torres LFB (2005). Uso prático da imunohistoquímica em patologia cirúrgica. *J Bras Patol Med Lab.* **41**: 353–64.

Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2000). Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* **24**: 1016–1019.

White MK, Cinti C (2004). A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol.* **285**: 105-111.

Wieczorek E, Stover R, Sebenik M (1997). Nonspecific nuclear immunoreactivity after antigen retrieval using acidic and basic solutions. *J Histotechnol.* **20**: 139–143.

Willingham MC (1999). Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem.* **47**:1101–1110.

Wood HG, Borden R. Biotin enzymes (1977). *Ann Rev Biochem.* **46**:385–413.

Wyllie AH (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis.* **11**: 95–103.

Yagi T, Terada N, Baba T, Ohno S (2002). Localization of endogenous biotin-containing proteins in mouse Bergmann glial cells. *Histochem J.* **34**: 567–572.

Yamashita, S (2007). Heat-induced antigen retrieval: Mechanisms and application to histochemistry. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry.* **41**: 141-200.

Yaziji H, Barry T (2006). Diagnostic Immunohistochemistry: what can go wrong? *Adv Anat Pathol* **13**: 238–246.

Young B, Heath JW (2001). *Weather histologia funcional: Texto e atlas em cores* (4. Ed). Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 409 p.

Zhang J, Campbell RE, Ting A, Tsien RY (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**: 906-918.

Ziegler U, Groscurth P (2004). Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* **19**: 124-128.

Zong WX, Thompson CB (2006). Necrotic death of a cell fate. *Genes Dev.* **20**: 1-15.

Zucker RM, Hunter ES, 3rd, Rogers JM (2000). Confocal laser scanning microscopy of morphology and apoptosis in organogenesis-stage mouse embryos. *Methods Mol Biol.* **135**: 191-202.