

TÉCNICA DE PEROXIDASE-ANTIPEROXIDASE (PAP) EM BIÓPSIA RENAL: ESTUDO COMPARATIVO

EUZENIR NUNES SARNO
LEILA MARIA MACHADO VIEIRA
FREDERICO RUZANY
CELIA SZWARCWALD
JAYME LANDMANN

Os métodos de imunoperoxidase têm muito em comum com os da imunofluorescência para a demonstração de antígenos teciduais e celulares como no campo das doenças renais relacionadas a imunoglobulinas e imunocomplexos.

Neste trabalho os autores fazem um estudo comparativo da sensibilidade dos dois métodos (IF e PAP) em tecido de congelação e blocos parafinizados de material de biópsia renal. A análise estatística dos resultados mostrou uma concordância significativa entre a IF de congelação e a imunoperoxidase em tecido parafinizado com exceções para a detecção de frações de complemento e de fibrinogênio. Não houve concordância entre a IF em congelação e IF em tecido parafinizado.

A técnica de imunofluorescência data de 1941, quando Coons Creech & Jones (1941) conseguiram conjugar compostos de isotiocianato de fluorescência com anticorpos. Durante os anos seguintes houve larga aplicação da técnica trazendo contribuições à imunologia e à imunopatologia, inclusive no setor das doenças renais onde constitui o método de eleição para a detecção de imunoglobulinas e depósitos de imunocomplexos em material de biópsia renal.

As principais desvantagens da técnica da imunofluorescência são: necessidade de microscopia especializada; o fato de os preparados não serem permanentes e o material não poder ser guardado para exames repetidos ou retrospectivos senão em fotografia; dificuldade para utilização na imunofluorescência de material parafinizado, por conjugação inespecífica e redução antigênica do material fixado, impedindo assim o estabelecimento de uma correlação entre a microscopia ótica e a imunofluorescência; o fato do material de biópsia tecidual ter de ser processado de imediato, exigindo uma íntima e rápida cooperação com o patologista sob pena de perda de todo trabalho Taylor (1978). Finalmente, quando o material obtido por biópsia é exíguo não é possível a separação em dois espécimens: um para congelação e outro em parafina, havendo indecisão do médico, ainda mais que em muitos dos casos a lesão não se verifica nas duas amostras Huang, Minassian & More (1976).

Surgiu assim a demanda de sistemas alternativos que evitassem ao máximo essas desvantagens, os mais importantes dos quais surgiram após o advento de anticorpos mar-

cados por enzimas Nakane & Pierce (1976) e Avrameas & Uriel (1966) e são conhecidos hoje com o título geral de técnicos de imunoperoxidase que se devem principalmente a Avrameas & Uriel (1966), Nakane & Pierce (1966) e Sternberger (1974).

A utilização da técnica de imunoperoxidase e mais especificamente o da ponte enzimática peroxidase-antiperoxidase (PAP) permitiu corrigir as desvantagens da imunofluorescência, particularmente quando aplicada a tecidos embebidos em parafina e fixados por formaldeído. Muitos antígenos podem ser visualizados pela microscopia óptica, o detalhe morfológico é excelente (equivalente a qualquer preparado eosina-hematoxilina) e os estudos retrospectivos podem ser feitos em blocos de parafina previamente estocados. Além disso, os métodos de imunoperoxidase são aplicáveis aos exames com microscopia eletrônica criando um campo inteiramente novo para a precisão da ultra-estrutura imunocitoquímica. Os princípios e as práticas desse novo método têm muito em comum com os da imunofluorescência. Ambas têm elevado potencial para demonstração de antígenos e ambas têm limitações no que concerne a um rigoroso controle de especificidade Taylor (1978). Na literatura mundial, a sensibilidade dos métodos de imunoperoxidase compara-se favoravelmente com os procedimentos de imunofluorescência Taylor (1978), Avrameas (1972) e Bellon, Sapin & Druet (1975).

O objetivo desse trabalho foi o de comparar a sensibilidade e a especificidade dos métodos de imunofluorescência com os da imunoperoxidase em material de biópsia renal, estocada em bloco de parafina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 25 fragmentos de biópsias renais provenientes de igual número de pacientes com glomerulopatias em que o material de congelação mostrou na imunofluorescência a presença de imunoglobulinas ou complemento ou fibrinogênio ou uma combinação desses elementos. A obtenção de espécimens para congelação e para parafina foi efetuada na mesma ocasião. Todos os fragmentos de biópsia renal foram submetidos às 3 técnicas: imunofluorescência em material de congelação, imunofluorescência em material parafinizado e imunoperoxidase (PAP) em material parafinizado.

Paralelamente 20 espécimens de biópsia renal examinados por imunofluorescência em tecido congelado e negativos para a presença de imunoglobulinas, complemento ou fibrinogênio foram submetidos à imunoperoxidase em material parafinizado e utilizados como controle negativo da reação. Todos os espécimens, antes da inclusão em parafina, foram fixados em formaldeído a 10%.

Os reagentes utilizados foram testados quanto à sua especificidade pela técnica de imunodifusão radial contra imunoglobulinas, fibrinogênio e complemento pela formação de uma única linha de precipitação com o antígeno correspondente Vieira et al (1979).

As diluições dos soros empregados foram determinadas previamente por titulação.

Imunofluorescência: os cortes foram desparafinizados em xilol a 37°C, por 30 min, reidratados e digeridos com pronase a 0,1% em tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 7,6 por 15 min a 37°C. Lavados durante 60 min em Tris/HCl (para paralisar a ação da pronase). Em seguida incubados com os anti-soros não fluoresceinados (anti-IgG, IgA, IgM, C1q, C3 e fibrinogênio humanos — Behringwerke) diluídos a 1/10, durante 30 min e lavados, posteriormente, em PBS pH 7,2 em três banhos de 10 min cada. A seguir tratados com soro de cabra antiimunoglobulina de coelho, fluoresceinado (Behringwerke) diluído a 1/16. Novamente lavados em três banhos de PBS de 10 min cada e montados com Evanol (polivinil álcool Du Pont).

Imunoperoxidase: as etapas iniciais são semelhantes à da IF em tecido parafinado. Após a incubação com pronase e lavagem em Tris/HCl, os cortes foram incubados com soro normal de cabra (20%) por 20 min, em seguida incubados com soros de coelho anti-IgG, IgA, IgM, C1q, C3 e Fibrinogênio (Behringwerke) diluídos a 1/10 por 30 min. Posteriormente à adição de soro de cabra antiimunoglobulina de coelho (Behringwerke), diluído a 1/20 durante 30 min os cortes foram incubados com o complexo peroxidase-antiperoxidase 1/50 (PAP, Miles, Lab. Inc.) produzido em coelho por 30 min e, finalmente revelados com solução de diaminobenzidina (diaminobenzidina 0,05% Baker Chemical Co. e H_2O_2 0,05%) e 10 a 20 min lavados em PBS, desidratadas e montadas com bálsamo do Canadá.

Metodologia estatística: para avaliação de concordância entre os métodos propostos e o padrão, utilizou-se a estatística de distribuição Kappa cuja significância foi dada pelo teste Z Fleiss (1973).

RESULTADOS

As biópsias renais que mostraram resultados positivos em tecido congelado pela IF foram reavaliadas simultaneamente em tecido parafinado pelos métodos da imunofluorescência e da imunoperoxidase (PAP).

Em apenas 7 dos 35 casos a IF em parafina apresentou resultados semelhantes a IF em tecido congelado (Fig. 1). Em 21 casos a imunoperoxidase comportou-se de maneira similar à IF (Fig. 2). A Tabela I mostra detalhadamente os resultados obtidos.

A correlação entre as técnicas foi avaliada em separado comparando os resultados para cada antígeno pesquisado. Os resultados comparativos entre a técnica de fluorescência em tecido fresco e a imunoperoxidase em parafina observam-se na Tabela II.

Não houve correlação para C1q e C3; o Fibrinogênio apresentou uma fraca concordância estatisticamente não significativa. As imunoglobulinas apresentaram boa concordância.

Os resultados entre imunofluorescência a fresco e o material de parafina está demonstrado na Tabela III. Não houve concordância significativa para nenhum dos antígenos estudados.

DISCUSSÃO

Na literatura mundial, os métodos de IF em tecido congelado comparam-se favoravelmente com os da imunoperoxidase inclusive em material de biópsia renal Taylor (1978), Avrameas (1972), Bellon, Sapin & Duret (1975), Denk, Syre & Weirich (1977) e Witting (1977).

Em apresentação prévia Vieira et al (1979) comparamos as duas técnicas obtendo depósitos de imunoglobulinas e complemento com aspecto e distribuição igual em material preservado a $-80^{\circ}C$. No presente trabalho, entretanto, não houve concordância no que se refere à presença de frações de complemento (C1q ou C3) e de fibrinogênio. A não detecção desses elementos no material parafinado sugere uma possível desnaturação dos sítios antigênicos das frações de complemento, durante o processamento do material. Os nossos resultados coincidem com os de Huang, Minassian & More (1976).

Embora não tenhamos feito um estudo comparativo entre vários métodos de fixação há relatos na literatura que fazem supor que eles teriam importância e aliados ao tempo e temperatura de inclusão na parafina concorreriam para a má preservação antigê-

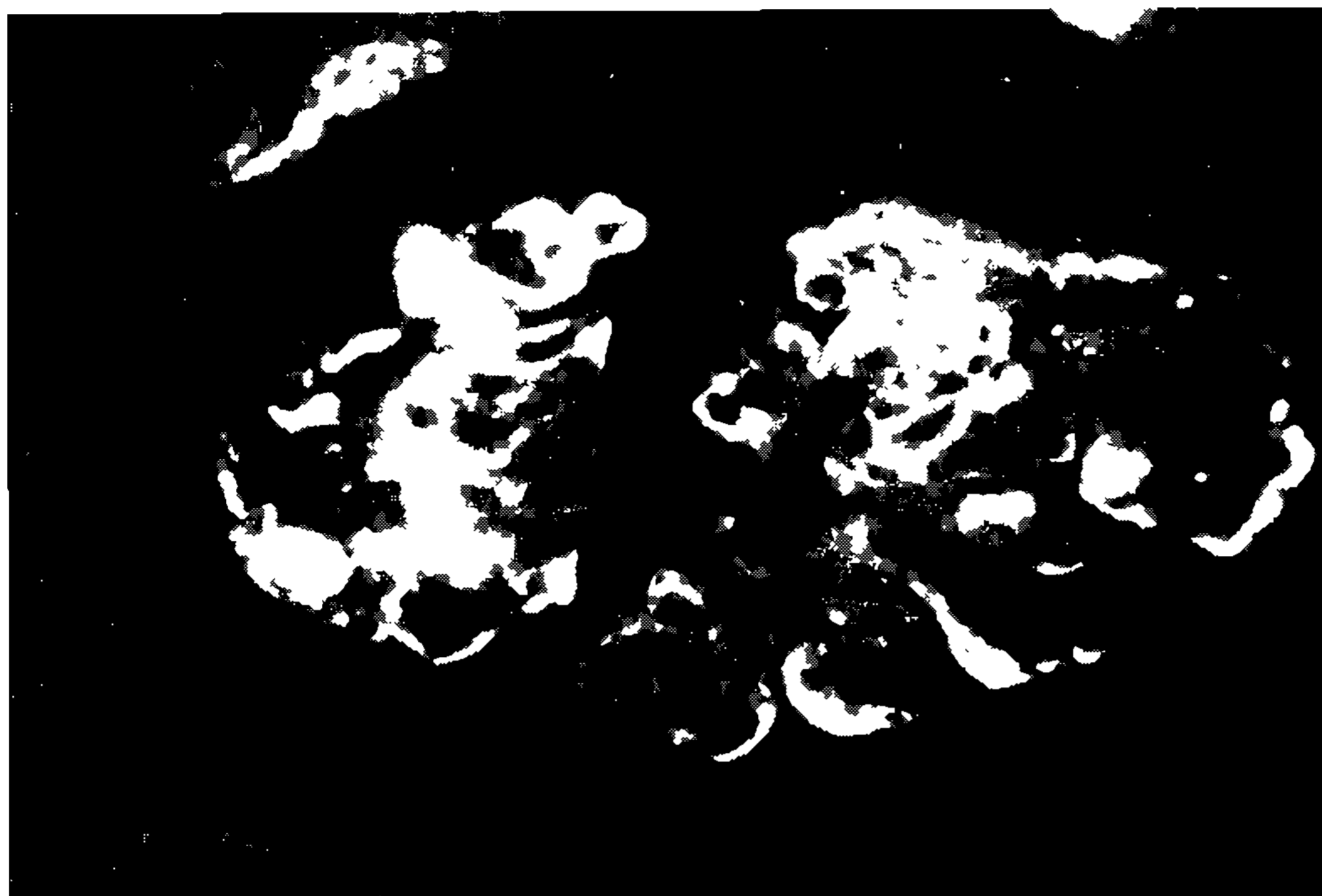


Fig. 1. Imunofluorescência em tecido parafinizado. Deposição granular de IgG em alça capilar e mesângio.

nica dos tecidos analisados. A fixação prolongada reduziria a reatividade para imunoglobulinas, lactoferrina e lisozima mesmo utilizando-se formaldeído tamponado que em geral dá bons resultados. A fixação em formaldeído velho, não tamponado, é prejudicial. Nem todos os antígenos resistem em igual intensidade à ação dos fixadores. A detecção de imunoglobulinas pelo PAP fortemente concordante com o método da IF pode, inclusive, significar uma maior sensibilidade de método da imunoperoxidase, que seria capaz de mostrar a presença de imunoglobulinas mesmo parcialmente remanescentes.

Acreditamos que a má preservação encontrada em alguns casos não tenha sido efeito da digestão enzimática uma vez que estudos anteriores de Denk, Syre & Weirich (1977) mostraram que a pronase além de diminuir a fluorescência inespecífica aumentou a sensibilidade da imunoperoxidase e da IF talvez por expor sítios antigênicos.

Concluimos que o método da IF embora de execução mais rápida nem sempre é viável em material parafinizado. O método da imunoperoxidase (PAP) por nós utilizado é significativamente concordante com o da IF em congelação em relação à detecção de imunoglobulinas. Novos tipos de fixadores talvez possam aumentar ainda mais a concordância ou a sensibilidade, o que contribuiria enormemente para evitar as desvantagens já assinaladas da IF em congelação.

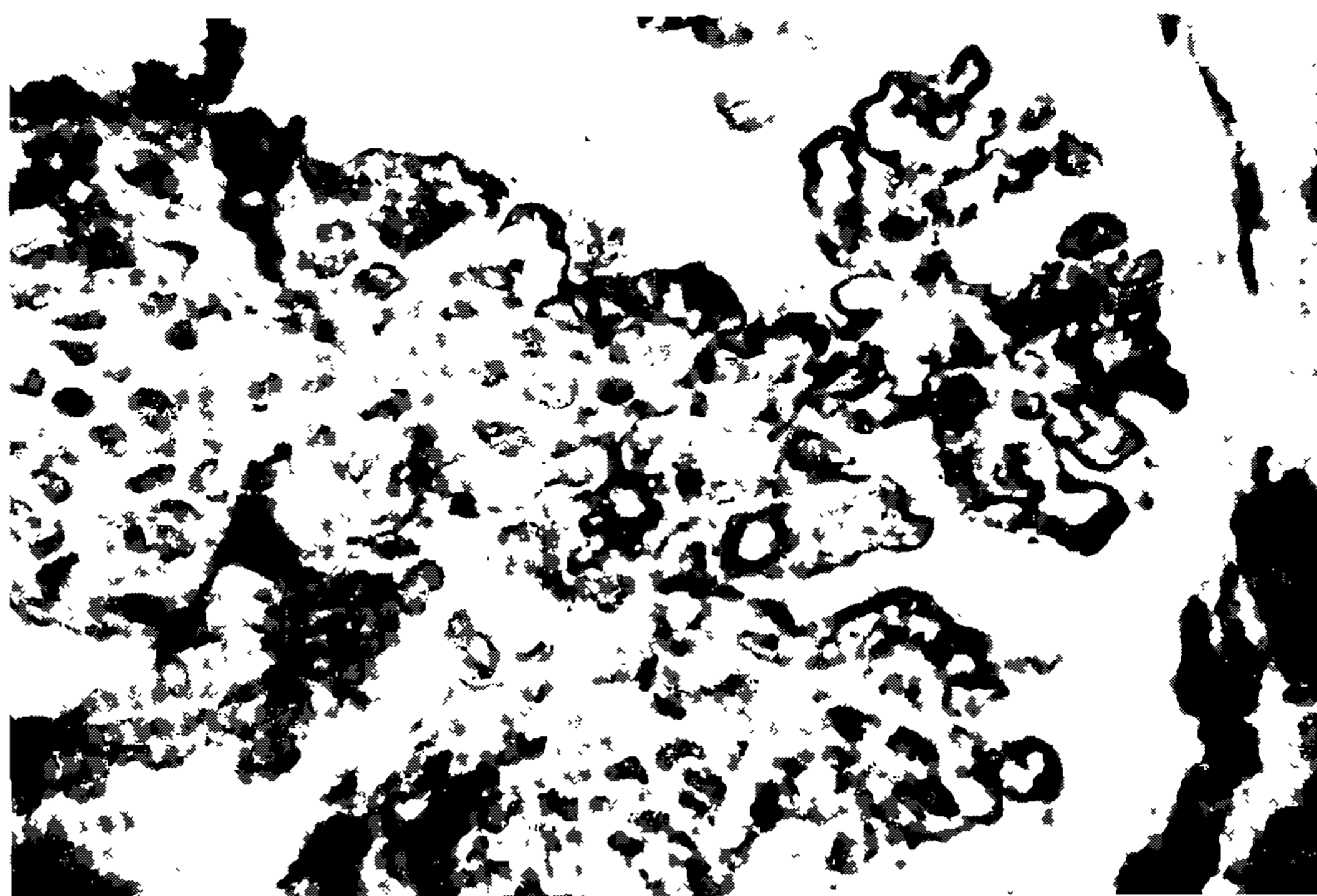


Fig. 2. Imunoperoxidase em tecido parafinizado. Deposição granular de IgG em segmentos de alça capilar.

TABELA I

Distribuição da Positividade nas Três Técnicas Utilizadas

Nº	<i>Biópsias Congeladas Imunofluorescência</i>	<i>Biópsias Incluídas em Parafina</i>	
		<i>Imunofluorescência</i>	<i>Imunoperoxidase</i>
1	IgG, C1q, C3	IgG	IgG
2	IgM	—	IgM
3	IgG	—	IgG
4	IgG, IgM, C3	—	IgG
5	IgM, C1q	IgM	IgM
6	IgG, IgA	IgG	IgG
7	IgG, C1q, C3	—	IgG
8	IgG, IgA, C1q, C3	IgG	IgG, IgA
9	IgG, C3	—	IgG
10	IgM	—	IgM
11	IgG, IgA, C3	IgG	IgG, IgA
12	IgG, IgM, C3	—	—
13	IgG, IgM, C1q, C3	IgG	IgG, IgM
14	IgM, IgA, C1q, C3	IgM	IgA, IgM
15	IgM, IgG	—	IgG, IgM
16	IgG, IgM	—	IgG, IgM
17	IgG, C3	—	IgG
18	IgG, IgA, Fibrinogênio, C3	—	—
19	IgM	—	—
20	IgG, IgM, Fibrinogênio, C1q	—	—
21	IgG, IgA, IgM, C3	—	IgG, IgA, IgM

TABELA I (continuação)

Nº	Biópsias Congeladas Imunofluorescência	Biópsias Incluídas em Parafina	
		Imunofluorescência	Imunoperoxidase
22	IgA, IgM	—	IgA, IgM
23	Fibrinogênio	—	Fibrinogênio
24	IgM	—	IgM
25	C3, Fibrinogênio	—	Fibrinogênio

TABELA II

Concordância (K) dos Métodos Imunoperoxidase em Cortes de Parafina com Imunofluorescência em Cortes Congelados

Nº Casos		IgG	IgA	IgM	C1q	C3	Fibrinogênio	Total
		<i>Imunoperoxidase</i>	13	5	10	0	0	2
<i>Positivos</i>	<i>Imunofluorescência</i>	15	7	14	7	13	4	25
Kappa		0,84	0,78	0,69	0	0	0,63	0,84
p		<0,01	<0,01	<0,01	—	—	N.S.	0,01

p = nível de significância
N.S. = não significativo

TABELA III

Concordância (K) dos Métodos Imunofluorescência em Cortes de Parafina com Imunofluorescência em Cortes Congelados

Nº Casos		IgG	IgA	IgM	C1q	C3	Fibrinogênio	Total
		<i>Parafina</i>	5	0	2	0	0	0
<i>Positivos</i>	<i>Congelação</i>	15	7	14	7	13	4	25
Kappa		0,29	0	0,13	0	0	0	0,28
p		N.S.	—	N.S.	—	—	—	N.S.

p = nível de significância
N.S. = não significativo

SUMMARY

Immunofluorescent (IF) and immunoperoxidase (PAP) technics have a lot in common in the detection of cellular and tissue antigens. In renal diseases they have been used in the detection of immunoglobulins and immune complexes. In the present paper the authors compare the technics of IF and PAP in paraffin sections to frozen renal biopsy sections by IF in 25 cases. There was significant correlation between IF of frozen renal biopsies with PAP of paraffin sections for immunoglobulins. There was no correlation for complement components and fibrinogen as well as for IF on paraffin sections for all components investigated. IF in paraffin sections was inadequate for the detection of deposits in renal glomeruli when performed in routine sections.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVRAMEAS S. & URIEL J., 1966 – Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec de enzymes et son application en immudiffusion. C.R. Acad. Sci. 262(24) :2543-2545.
- AVRAMEAS S., 1972 – Enzyme markers: their linkage with proteins and use in immunohistochemistry. A review. Histochem. J. 4(2) :321-330.
- BELLON B., SAPIN C. & DRUET P., 1975 – Comparaison de la sensibilité des techniques d'immunoflorescence et d'immunoperoxydase en méthodes directe et indirecte. Ann. Immunol. 126(1) :15-22.
- COONS A. H., CREECH H. J. & JONES R. N., 1941 – Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. 47(2) :200-202.
- DENK H., SYRE G. & WEIRICH E., 1977 – Immunomorphologic methods in routine pathology. Application of immunoflorescence and the unlabeled antibody-enzyme (peroxidase-antiperoxidase) technique to formalin fixed paraffin embedded kidney biopsies. Beitr. Path. 160(2) :187-194.
- FLEISS J., 1973 – Statistical methods for rates and proportion. John Welly and Sons. New York.
- HUANG S., MINASSIAN H. & MORE J. D., 1976 – Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. Lab. Invest. 35(4) :383-390.
- NAKANE P. K., PIERCE G. B. Jr., 1966 – Enzyme labeled antibodies: preparation and application for the localizations of antigens. J. Histochem. Cytochem. 14(12) :929-931.
- STERNBERGER L. A., 1974 – Immunocytochemistry. Englewood Cliffs, Prentice Hall Inc. N. J.
- TAYLOR C. R., 1978 – Immunoperoxidase techniques. Arch. Pathol. Lab. Med. 102(3) :113-121.
- VIEIRA L. M. M., SARNO E. N., RUZANY F. & LACERDA P. R. S., 1979 – Imunopatologia glomerular. Estudo comparativo entre imunofluorescência e imunoperoxidase. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol. 12(6) :377-381.
- WITTING C., 1977 – Immunofluoreszenoptische unter suchungen zur experimentall glomerulonephritis an formalin-fixierten und paraffin-eigebettetem gewebe. Klin. Wschr. 55(11) :561-562.