

Otimização da imunohistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixados com formaldeído

[*Optimization of immunohistochemistry for Bovine Herpesvirus 5 (BHV-5) detection on formalin-fixed tissues of the central nervous system*]

S.O. Hübner¹, C. Pescador², L.G. Corbellini², D. Driemeier², F.R. Spilki³, P.M. Roehé^{3,4}

¹Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Pelotas
Campus Universitário
96010-900 - Pelotas, RS

²Departamento de Patologia Clínica Veterinária – UFRGS – Porto Alegre, RS

³Departamento de Microbiologia – UFRGS – Porto Alegre, RS

⁴Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – FEPAGRO - Porto Alegre, RS

RESUMO

Com o objetivo de otimizar a técnica de imunohistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixado em formaldeído, foram avaliados diferentes métodos de digestão enzimática, diferentes anticorpos e reagentes para bloqueio de reações inespecíficas. As reações apresentaram a máxima intensidade de coloração específica e a quantidade mínima de coloração de fundo quando foram usadas protease de *Streptomyces griseus* (0,1%) ou proteinase K de *Tritirachium album limber* (0,05%), mediante incubação durante 15 minutos a 37°C. Entre os anticorpos monoclonais analisados, dois foram capazes de detectar BHV-5. As reações inespecíficas foram bloqueadas mais efetivamente pela incubação do tecido com caseína (0,5%), durante cinco minutos, ou leite em pó (2,5%), durante 60 minutos, ou soro equino (2,5%), durante 60 minutos. Com a técnica otimizada foi possível a detecção de BHV-5 em material de arquivo.

Palavras-chave: imunohistoquímica, recuperação antigênica, BHV-5, sistema nervoso central

ABSTRACT

In order to optimize immunohistochemical technique (IHC) for detection of Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) on formalin-fixed sections of central nervous system, different methods of enzymatic digestion, use of different antibodies and products for blocking of nonspecific reactivity were evaluated. The reactions showed the highest intensity of specific coloration and the minimum amounts of background when protease from Streptomyces griseus (0.1%) or proteinase K from Tritirachium album limber (0.05%) were used, incubating for 15 minutes at 37°C. Only two of the tested monoclonal antibodies specifically labelled BHV-5 antigen. The nonspecific reactions were blocked through incubation of tissues with casein (0.5%) for five minutes or powdered milk (2.5%) for 60 minutes or equine serum (2.5%) for 60 minutes. The optimized immunohistochemical method allowed the detection of BHV-5 antigen in histopathological archives.

Keywords: immunohistochemistry, antigen retrieval, BHV-5, central nervous system

Recebido para publicação em 24 de novembro de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 26 de abril de 2004

E-mail: sohübner@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A fixação de tecidos com formaldeído e o armazenamento em parafina são universalmente utilizados no diagnóstico histológico de rotina (Fox et al., 1985). O uso do formaldeído proporciona boa preservação da morfologia celular, embora cause alterações estruturais importantes nos antígenos teciduais, dificultando ou impedindo o reconhecimento pelos anticorpos em técnicas imunoistoquímicas (IHC) (Fox et al., 1985; Macintyre, 2000; Ramos-Vara e Beissenherz, 2000). Muitas das alterações produzidas pela fixação com formaldeído podem ser revertidas usando diversos métodos de recuperação antigênica (Shi et al., 1991), tais como aquecimento a altas temperaturas (Shi et al., 1991), forte tratamento com soluções ácidas ou alcalinas (Shi et al., 1997), uso de detergentes e digestão enzimática (Ramos-Vara e Beissenherz, 2000).

O herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) é o agente causador da encefalite por herpesvírus em bovinos (French, 1962), embora ocasionalmente o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) possa também causar encefalites (Roels et al., 2000). A enfermidade pode ser confundida com polioenfalomalácia, intoxicação pelo chumbo e outros agentes que conduzam a sinais clínicos do sistema nervoso central (Riet-Correa et al., 2002), além de causar surtos de grande importância econômica (Riet-Correa et al., 1989; Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002). A otimização da técnica adequada que permita diagnosticar BHV-5 em material de arquivo e pesquisar a distribuição de antígenos virais representaria uma contribuição importante para o estudo dessa infecção. O objetivo do trabalho foi otimizar a IHC utilizando-se protocolos de recuperação de antígenos de BHV-5 com enzimas proteolíticas, em tecidos do sistema nervoso central (SNC) fixados em formaldeído.

MATERIAL E MÉTODOS

Para otimização da técnica de IHC foram utilizadas amostras do SNC de um bovino com aproximadamente quatro meses de idade, naturalmente infectado com BHV-5, e de outro bovino da mesma idade, experimentalmente infectado com a amostra de BHV-5 EVI 88/95 (D'Arce et al., 2001). As amostras do SNC

foram imersas em formaldeído tamponado 4% (pH 7,4) por aproximadamente uma semana à temperatura ambiente, processadas e incluídas em parafina. Como controle negativo foram utilizadas amostras do SNC de bovino não infectado, da mesma idade, incubadas com os mesmos anticorpos específicos e conjugados. Para avaliação da técnica foram ainda analisados tecidos do SNC de um bovino que morreu de encefalite em 1986 (Mendez et al., 1987) e de outro acometido de encefalite em 2002 (Colodel et al., 2002). Em ambos os casos, embora as lesões sugerissem encefalite herpética, o tecido cerebral não foi submetido a isolamento ou não foi obtido isolamento viral.

Cortes histológicos seriados de 5µm de espessura foram obtidos pelo método convencional. Os cortes histológicos foram aplicados sobre lâminas recobertas com solução de gelatina 0,3% e fixados a 60°C durante 24 horas, após o que as lâminas foram submetidas à IHC.

Após a remoção da parafina mediante imersão em xilol, foi feita reidratação dos cortes com graduações de álcool. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas, lavadas com solução salina fosfatada; 0,01M (PBS), com pH ajustado para 7,4, foram submetidas aos procedimentos que buscassem a recuperação antigênica.

Os reagentes avaliados para a recuperação dos antígenos virais no material fixado foram tripsina¹, protease de *Streptomyces griseus*² e proteinase K³ de *Tritirachium album limber*. As amostras do SNC foram tratadas com tripsina 0,1% (1mg/ml) em PBS (pH 7,4) por 10 minutos a 37°C em câmara úmida. Após lavagem com PBS foram colocadas em tampão citrato 10mM (pH 6,0) durante dois minutos em forno de microondas doméstico⁴ a 1600w (potência máxima). A protease foi utilizada a 0,05%, 0,1% ou 0,2% em PBS (pH 7,4) e incubada por 15 minutos a 37°C em câmara úmida. A proteinase K foi testada em três concentrações, 0,005%,

¹ Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

² Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA

³ Gibco BRL, Carlsbad, Califórnia, USA

⁴ CCE da Amazônia S.A., Manaus, Amazonas, Brazil

Otimização da imunistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5...

0,025% e 0,05%, em PBS (pH 7,4), por 15 minutos a 37°C em câmara úmida.

Após submeter os cortes à ação enzimática, avaliou-se o bloqueio de reações inespecíficas, utilizando-se caseína⁵ a 0,5%, leite em pó desnatado⁶ a 2,5% e soro eqüino a 2,5%. Os reagentes para bloqueio foram diluídos em PBS (pH7,4). As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida, por 5min para caseína, 5, 10 e 60min para o leite em pó e 15 e 60min para o soro eqüino⁷.

Os cortes foram cobertos com solução contendo o anticorpo primário diluído em PBS. Foram avaliados três soros policlonais, dois soros policlonais obtidos após a imunização de coelhos com BHV-5 e um soro policlonal dirigido contra BHV-1⁸. Oito anticorpos monoclonais produzidos contra antígenos do BHV-5 também foram utilizados (4E4, 306A3, 2F9, 101208, 2E2912, 2A6H4, HB24I e 22C1H6). Os anticorpos monoclonais (Oldoni et al., 2002) foram utilizados na forma de sobrenadantes de cultura sem diluições subseqüentes. Cada anticorpo foi testado em incubação sobre o tecido por uma hora a 37°C ou *overnight* a 4°C.

Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados durante 30 minutos com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho⁹ conjugado à biotina) e diluídos conforme recomendação do fabricante. As lâminas foram incubadas com o complexo peroxidase-estreptavidina-biotina⁹ durante 30 minutos. A reação foi revelada com 3',3 - diaminobenzidina¹⁰ (DAB a 1mg/ml, acrescido de 25µl de H₂O₂ no momento do uso). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, desidratados em variados graus de álcool, limpos em xilol e montados com Entellan¹¹.

Na avaliação das lâminas foram consideradas reações específicas somente aquelas associadas à marcação de células inflamatórias, células da glia

e neurônios, e que contrastavam com o tecido adjacente de forma evidente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As enzimas proteinase K e a protease de *Streptomyces* permitiram a detecção de antígenos do BHV-5. Os resultados dos testes imunistoquímicos são apresentados na Tab. 1. A digestão com proteinase K a 0,05% ou protease a 0,1% durante 15 minutos a 37°C resultou em reação de máxima intensidade de coloração específica.

Os resultados da avaliação de bloqueadores de reações inespecíficas são apresentados na Tab. 2. As reações inespecíficas foram bloqueadas mais efetivamente por incubação do tecido com caseína (0,5%), durante cinco minutos, ou por leite em pó (2,5%), durante 60 minutos, ou por soro eqüino (2,5%), durante 60 minutos.

A detecção do antígeno de BHV-5 foi possível utilizando-se os anticorpos monoclonais 4E4 e 2F9. A maior intensidade de marcação foi observada com o anticorpo monoclonal 2F9 (Fig. 1). A detecção de antígenos do BHV-5 (dados não mostrados) também foi possível utilizando-se anticorpo policlonal comercial. Não foi possível detectar BHV-5 pelos utilizados com os dois soros policlonais obtidos mediante imunização em coelhos, nem tampouco com os demais anticorpos monoclonais testados. Não foram detectadas marcações quando os soros e anticorpos monoclonais foram utilizados sobre as amostras de SNC de bovinos não infectados.

A técnica otimizada possibilitou a detecção de BHV-5 em cérebro de casos de encefalite ocorridos em 1986 (Mendez et al., 1987) e 2002 (Colodel et al., 2002). Em ambos casos BHV-5 foi detectado em neurônios, células da glia e em células mononucleares do infiltrado perivascular.

⁵ VETEC da Amazônia S.A, Manaus, Amazonas, Brazil

⁶ Nestlé, Vevey, Switzerland

⁷ Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA

⁸ VMRD: Veterinary Medical Research and Development, Inc., Pullman, USA

⁹ Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA

¹⁰ Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA

¹¹ Merck, Darmstadt, Germany Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA

Tabela 1. Resultados da digestão enzimática para a detecção de BHV-5 em cérebro fixado com formaldeído * seguido os reagentes

Reagente						
Tripsina (0,1%)a	Protease (0,05%)b	Protease (0,1%)b	Protease (0,2%)b	Proteinase K (0,005%)b	Proteinase K (0,025%)b	Proteinase K (0,05%)b
-	-	+++	++	-	++	+++

* -: negativo para presença do antígeno; +: fraco positivo; ++: moderado; +++: forte; a: incubação por 10 minutos à temperatura de 37°C e posteriormente em tampão citrato 10mM (pH 6,0) durante dois minutos no microondas a 1600w (potência máxima); b: incubação durante 15 minutos à temperatura de 37°C. Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo monoclonal 2F9.

Tabela 2. Resultados imunistoquímicos para detecção de BHV-5 em cérebro, com diferentes protocolos de bloqueio de reações inespecíficas**

Método de bloqueio					
Caseína 0,5% ^a	Leite em pó 2,5% ^b	Leite em pó 2,5% ^c	Leite em pó 2,5% ^d	Soro equino 2,5% ^e	Soro equino 2,5% ^f
-	++	++	-	+	-

** -: ausência de reações inespecíficas; +: poucas reações inespecíficas; ++: muitas reações inespecíficas; a: incubação durante cinco minutos à temperatura ambiente; b: incubação por cinco minutos à temperatura ambiente; c: incubação por 15 minutos à temperatura ambiente; d: 60 minutos à temperatura ambiente; e: 15 minutos à temperatura ambiente; f: 60 minutos à temperatura ambiente.

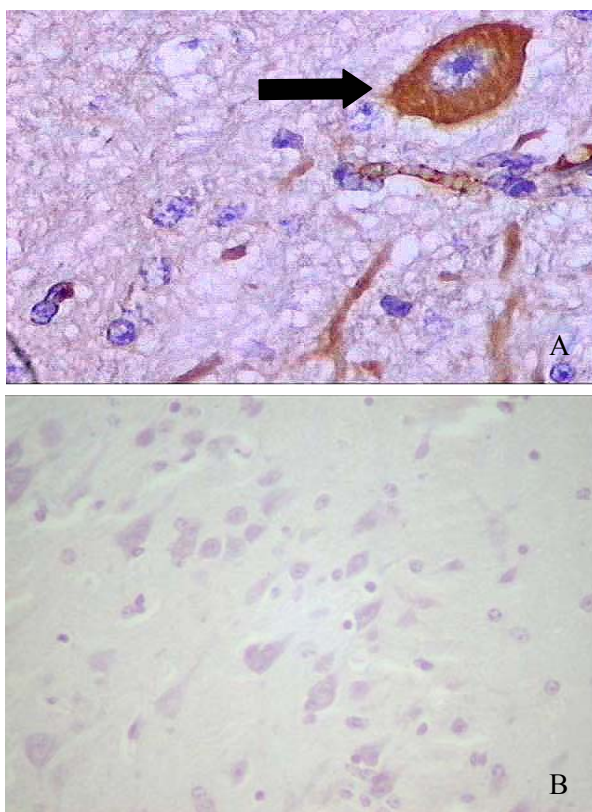


Figura 1. Técnica de imunistoquímica (IHC) para detecção de BHV-5. (A) neurônio positivo para antígeno de BHV-5 (seta) em corte histológico de cérebro de animal infectado experimentalmente. (B) reação de IHC realizada em cérebro de bovino não infectado. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris. Aumento 40x.

Otimização da imunistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5...

A imunistoquímica foi adaptada para a detecção de BHV-5 em amostras fixadas em formaldeído em função do seu uso universal em técnicas histológicas. O formaldeído promove ligações cruzadas entre sítios reativos dentro da mesma proteína ou entre proteínas, através de pontes de metileno (Fox et al., 1985), modificando a estrutura terciária e quaternária das proteínas (Mason e O'leary, 1991). Graças a essas alterações, a imunorreatividade para muitos antígenos pode ser perdida, reduzida ou muito dificultada. Os métodos de recuperação antigênica utilizados em imunistoquímica têm a finalidade de quebrar essas ligações cruzadas, visando expor os epitopos ao reconhecimento pelos anticorpos (Shi et al., 1997). Suspeita-se que a exposição à proteólise aumente a permeabilidade do tecido, o que facilitaria o acesso de anticorpos (Macintyre, 2000). Nesse sentido, foi avaliado o uso de três enzimas proteolíticas (hidrolases peptídicas) para aumentar o acesso do antígeno alvo aos anticorpos testados. Embora técnicas de IHC para detecção de BHV-5 tenham sido anteriormente estudadas, nelas empregou-se o sistema peroxidase-anti-peroxidase ou outro fixador (Meyer et al., 2001). Acredita-se que o sistema avidina-biotina utilizado no presente trabalho tenha maior sensibilidade do que o sistema peroxidase-anti-peroxidase (Bullock e Petrusz, 1989). Além disso, o uso de outro fixador que não o formaldeído é de difícil implementação na rotina de laboratório de diagnóstico histológico (Dapson, 1993).

Neste trabalho foram utilizadas as enzimas tripsina, proteinase K e a protease de *Streptomyces griseus*, todas serina-proteases que clivam proteína nas pontes peptídicas que envolvem o grupo carboxila de arginina ou lisina (Darling e Morgan, 1994). O tratamento com tripsina combinou a ação proteolítica à do calor, mas não possibilitou a recuperação de antígenos do BHV-5. Assim, não está claro se esse protocolo não foi suficiente para viabilizar o acesso dos anticorpos aos antígenos. É possível que os epitopos envolvidos tenham sido destruídos pela combinação desses dois agentes. O tratamento dos tecidos com proteinase K e protease de *Streptomyces griseus* consistiu somente de proteólise e foi adequado para a detecção de antígenos do BHV-5. A proteinase K de *Tritirachium album limber* foi eficaz na recuperação de antígenos do BHV-5 em cérebro

de animais infectados em concentração menor do que a obtida por protease de *Streptomyces griseus*. O uso de proteinase K na recuperação específica de antígeno de BHV-5 já foi relatado por d'Offay et al. (1995), porém em menor concentração (0,0025%) e tempo (oito minutos à temperatura de 37°C) do que os utilizados neste trabalho (0,05% por 15 minutos à temperatura de 37°C). O uso de maior concentração de enzima proteolítica, com exposição mais prolongada, pode ter sido consequência da fixação em formaldeído por período mais longo que os descritos por d'Offay et al. (1995) e Macintyre (2000). Dados indicam que imunorreatividade dos antígenos diminui progressivamente durante esse processo (Battifora e Kopinski, 1986; Macintyre, 2000). A intensidade na qual a digestão deverá ser feita pode depender do tipo de antígeno a ser recuperado e do tipo de tecido a ser analisado. Além disso, o efeito da ação enzimática é dependente de uma combinação entre concentração de enzima, temperatura e duração da digestão, por isso tem sido relatadas diferenças marcantes na detectabilidade de diferentes antígenos.

Não foram encontradas dificuldades no bloqueio de reações inespecíficas, embora isso possa ocorrer em alguns tecidos (Bullock e Petrusz, 1989). O fator mais importante para o adequado bloqueio das reações inespecíficas foi o tempo de incubação.

O tratamento com as enzimas proteinase K ou com a protease de *Streptomyces griseus* possibilitou o reconhecimento antigênico somente pelos anticorpos monoclonais 4E4 e 2F9. Isso pode ser explicado pela destruição dos epitopos reconhecidos pelos outros anticorpos, reconhecimento de epitopos diferentes na mesma ou em outra molécula e pela diferença na afinidade entre os anticorpos. Assim, para cada anticorpo a ser utilizado em IHC é necessário avaliar a metodologia de recuperação antigênica para se obter o reconhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTIFORA, H.; KOPINSKI, M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *J. Histochem. Cytochem.*, v.34, p.1095-1100, 1986.

- BULLOCK, G.R.; PETRUSZ, P. *Techniques in immunocytochemistry*. 4.ed. San Diego: Academic, 1989. 306p.
- COLODEL, E.M.; NAKASATO, L.; WEIBLEN, R. et al. *Ciê. Rural*, v.32, p.293-298, 2002.
- D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C. et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet. Microbiol.*, v.88, p.315-324, 2002.
- DAPSON, R.W. Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments. *Biotech. Histochem.*, v.18, p.11-16, 1993.
- DARLING, D.C.; MORGAN, S.J. *Animal cells - culture and media*. London: Wiley, 1994. 151p.
- D'OFFAY, J.M.; ELY, R.W.; BALDWIN, C.A. et al. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.7, p.247-251, 1995.
- EBELING, W.; HENRICH, N.; KLOCKW, M. et al. Proteinase K from *Tritirachium album Limber*. *Europ. J. Biochem.*, v.47, p.91-97, 1974.
- ELY, R.W.; D'OFFAY, J.M.; RUEFER, A.H. et al. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.8, p.487-492, 1996.
- FOX, C.H.; JOHNSON, F.B.; WHITING, J. et al. Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.*, v.33, p.845-853, 1985.
- FRENCH, E.L.A. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Aust. Vet. J.*, v.38, p.216-221, 1962.
- GUTIERREZ, M.; FORSTER, F.I.; MCCONNELL, S.A. et al. The detection of CD2+, CD4+, CD8+ and WC1+T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.71, p.321-334, 1999.
- KOK., L.P.; BOON, M.E. *Microwave cookbook for microscopists*. 3.ed. Leyden: Coloumb, 1992. 432p.
- MACINTYRE, N. Unmasking antigens for immunohistochemistry. *Br. J. Biomed. Sci.*, v.8, p.190-196, 2001.
- MASON, J.T.; O'LEARY, T.J. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a colorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J. Histochem. Cytochem.*, v.39, p.225-229, 1991.
- MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. et al. Doenças diagnosticadas no ano de 1986. *Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico*. Pelotas: Ed. da UFPel, 1987. P.30.
- MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C. et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infectious of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch. Virol.*, v.146, p.633-652, 2001.
- OLDONI, I.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) isolate. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 2002, São Paulo. *Anais...* São Paulo, p.117. Resumo.
- RAMOS-VARA, J.A.; BEISSENERHERZ, M.E. Antigen retrieval methods to optimize diagnostic immunohistochemistry: experience with 63 markers. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.12, p.307-311, 2000.
- RIET-CORREA, F.; RIET-CORREA, G.; SCHILD, A.L. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e eqüídeos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.22, p.161-168, 2002.
- RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L. et al. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpes vírus bovino -1. *Pesq. Vet. Bras.*, v.9, p.13-16, 1989.
- ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C. et al. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet. Rec.*, v.13, p.586-588, 2000.
- SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.; RIET-CORREA, F. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.18, p.76-83, 1998.
- SHI, S-R.; COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present and future. *J. Histochem. Cytochem.*, v.45, p.327-343, 1997.
- SHI, S-R.; KEY, M.E.; KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, v.39, p.741-748, 1991.