

Imuno-Histoquímica: aplicações em patologia oral

João Carlos Bacarelli¹

RESUMO

O presente artigo de revisão, destina-se a profissionais da área de saúde, particularmente odontólogos. Visa fornecer um panorama do emprego de métodos imuno-histoquímicos em patologia oral, que cada dia mais estão sendo utilizados na pesquisa e no diagnóstico oncológico.

Unitermos: Imunohistoquímica, patologia bucal, antígenos.

INTRODUÇÃO

Imunologia: origem

A imunologia iniciou-se como parte da microbiologia, desenvolvendo-se a partir de doenças infecciosas e das respostas do organismo às mesmas. Ao longo dos tempos, apresentou diversas fases com ênfase na sorologia, na imunologia celular, na imunologia molecular e na imunogenética.

A imunologia sempre dependeu e estimulou a aplicação de tecnologia como o uso da microscopia, eletroforese, marcação por meio de rádio-isótopos e enzimas, imunofluorescência, recombinação de DNA e camundongos transgênicos. Engloba ainda, vários campos, tais como a alergia, imunologia clínica, imunopatologia, imunofarmacologia, imuno-histoquímica, imunologia tumoral e transplantes¹⁶.

Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é um método que pode ser aplicado em cortes histológicos e em preparados

citológicos. Baseia-se no reconhecimento de determinados antígenos por anticorpos marcados.

O princípio de todos os métodos imuno-histoquímicos é a identificação de antígenos (Ag) celulares ou teciduais, por uma reação antígeno anticorpo (Ag - Ac) "*in situ*".

Essa reação é visualizada por moléculas reveladoras, tais como fluorocromos, enzimas e partículas de ouro coloidal ou pelos vários sistemas de detecção que abordaremos a seguir.

Imunofluorescência

Entre as formas de detecção dos antígenos teciduais temos a imunofluorescência.

A microscopia de imunofluorescência foi introduzida, em 1941, por A. H. COONS et al.⁵ e baseia-se em anticorpos marcados com corantes fluorescentes, ou seja fluorocromos.

Existem várias técnicas de imunofluorescência, e a *direta* foi a primeira a ser utilizada, aparecem ainda, a *técnica indireta* ou de dupla camada e *técnica do sanduíche* utilizando imuno-soro anticomplemento; cada uma apresentando aplicações e vantagens próprias³.

(1) Mestre, Professor Adjunto da Clínica de Propedêutica Odontológica do Departamento de Medicina Bucal da Faculdade de Odontologia e do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da PUCCAMP.

A imunofluorescência apresenta alguns inconvenientes como necessidade de microscópio especializado, de material fresco e congelado, é pobre em resolução morfológica e os cortes preparados não são permanentes não podendo ser arquivados para estudos posteriores^{13, 17}.

Técnicas Imunoenzimáticas

Na tentativa de superar as desvantagens inerentes à imunofluorescência, surgiram para a detecção de antígenos, as técnicas imunoenzimáticas, utilizando enzimas como marcadores^{9, 15}.

Várias técnicas foram testadas sendo que as de imunoperoxidase se mostraram as mais adequadas. As técnicas de peroxidase-anti-peroxidase (PAP) e Avidina-Biotina-Peroxidase (ABP) são os métodos mais largamente empregados na rotina dos laboratórios de patologia cirúrgica e experimental^{6, 9, 13, 15, 17}.

Nestas técnicas, a peroxidase é usada como enzima marcador de anticorpos. Proporcionam cortes histológicos marcados de forma permanente e que podem ser analisados ao microscópio ótico comum. Outra vantagem desta reação Ag-Ac é que pode ser efetuada com cortes histológicos incluídos em parafina, além dos cortes em congelamento¹⁷.

Com a recente utilização de fornos de microondas, um dos inconvenientes da técnica, ou seja, o da utilização de cortes fixados em formol e incluídos em parafina está sendo largamente superada podendo ser utilizada não só para cortes congelados (material fresco) mas também em material de arquivo.

Os métodos imunoenzimáticos apresentam graus diferentes de sensibilidade. A sensibilidade de um método pode ser definida como a técnica que detecta a menor quantidade de Ag tecidual com a mínima quantidade de Ac primário. Depende ainda da quantidade de Ac, da estrutura química do determinante antigênico a ser detectado, bem como da metodologia empregada.

Tanto no método PAP quanto ABP, a visualização da reação antígeno-anticorpo no tecido pode ser feita utilizando-se o 3,3 tetra-hidroclorato de diaminobenzidina (DAB) que forma um precipitado insolúvel de cor marrom que pode ser visto ao microscópio ótico comum. Através da contracoloração dos núcleos com hematoxilina pode-se também visualizar os detalhes citológicos^{6, 17}.

Principais aplicações dos métodos imuno-histoquímicos

Basicamente, os métodos imuno-histoquímicos têm sido utilizados em trabalhos de pesquisa sobre a origem de determinado processo patológico e no diagnóstico oncológico.

Assim, uma das principais aplicações é no diagnóstico dos tumores indiferenciados como os linfomas não Hodgkin, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, rabdomiossarcoma embrionário, tumores neuroectodérmicos, carcinomas fusocelulares, melanomas, sarcomas como fibro, leio e rabdomiossarcoma e tumores anaplásicos em geral.

São aplicados ainda no estudo da origem de tumores metastáticos, na detecção de receptores hormonais no carcinoma de mama, etc. Também é possível a detecção em tecidos de antígenos virais, bacterianos, etc.

Anticorpos mais freqüentemente utilizados

Existem inúmeros anticorpos⁷ utilizados em imuno-histoquímica, dos quais podemos citar:

- marcadores epiteliais, sendo os mais comuns os anticorpos anti-citoqueratinas (CK), antígeno carcino-embriônico (CEA), antígeno epitelial de membrana (EMA), involucrina;
- marcadores estromais; vimentina, proteína S-100, desmina, actinas, etc;
- marcadores hemo-linfopoiéticos, a maioria designados por CD (CD4, CD15, CD20, CD45, etc.);
- marcadores endócrinos e de melanomas como a proteína S-100 e o HMB-45 (anticorpo específico anti-melanomas);
- marcadores para avaliação de proliferação celular como p53, o Ki67 e PCNA (Antígeno de proliferação celular nuclear) que são mais utilizados em pesquisa, e
- marcadores de membrana basal, inclusive de vasos, como o colágeno IV e laminina.

Além desses, podemos citar marcadores para identificação da origem de tumores, para receptores de estrógeno e progesterona, etc.

Aplicações comuns dos métodos imuno-histoquímicos em patologia oral

Em patologia oral, a aplicação dos métodos imuno-histoquímicos pouco difere do restante do organismo.

Dessa forma, têm sido aplicados de maneira mais diversa possível, entre outras podemos citar:

1. No diagnóstico do câncer oral:
 - diagnóstico diferencial de tumores indiferenciados;
 - oncogênese das células tumorais;
 - origem dos carcinomas metastáticos;
 - diagnóstico diferencial de lesões melanocíticas e malignas;
 - identificação dos vários tecidos que compõem as neoplasias de glândulas salivares;
 - relação entre lesões cancerizáveis (leucoplásicas) e neoplásicas e
 - estudo dos linfomas não Hodgkin.
2. Identificação de antígenos virais do EBV (Vírus Epstein Barr) e HPV (papilomavírus humano) com ênfase às associações com leucoplasia pilosa causada pelo HIV.
3. Expressão do cito-megalovírus associado ao vírus herpes simples e infecção pelo HIV.
4. Patologia de lesões radiculares dos dentes: granulomas e cistos periapicais; no estudo da origem do epitélio e presença de imunoglobulinas nas células inflamatórias.
5. Lesões gengivais e periodontais: estudo imuno-histoquímico das células inflamatórias presentes e expressão dos vários tipos de colágeno.
6. Tumores odontogênicos como cisto e ameloblastomas: diagnóstico diferencial e oncogênese.
7. Estudo dos oncogenes virais no papiloma oral.

A título de ilustração enumeramos alguns trabalhos atuais que procuram reportar as várias aplicações da imuno-histoquímica em patologia oral.

No diagnóstico do câncer oral, OGDEN et al.¹², utilizaram a oncoproteína p53 como marcador, a qual está fortemente associada a processos malignos.

Foram investigados cortes de tecidos normais e lesões malignas da mucosa oral pela presença de p53 usando anticorpos policlonais CM1 contra a proteína p53.

A proteína p53 foi identificada em 8 cortes de 12 biopsias positivas de câncer oral. Não foi encontrada em 8 casos negativos e 40 cortes de tecidos normais da mucosa oral. Segundo o autor, isso sugere que a expressão de p53 e lesões suspeitas clinicamente de malignidade pode ter grande valor no diagnóstico do carcinoma oral.

NISHIOKA et al.¹¹, detectaram a presença de p53 em carcinoma de células escamosas e leucoplasia da mucosa oral. De 40 pacientes com carcinoma de célula escamosa foi encontrada positividade em 52%, e de 20 pacientes com leucoplasias, 10% expressaram p53, o que poderia sugerir que estes casos teriam um potencial maior de malignização.

Como citamos anteriormente, a imuno-histoquímica é utilizada para estabelecer as diferenças entre lesões melanocíticas (pigmentadas) orais benignas e malignas.

GAZIT et al.¹⁸, usaram como marcadores antígenos HMB-45 e S-100 em lesões pigmentadas benignas e malignas de células redondas e fusiformes.

Nos melanomas compostos de células redondas, a intensidade e distribuição do HMB-45 é o maior que a do S-100. O oposto ocorre com melanomas de células fusiformes.

O nevo intra mucoso de células redondas expressa S-100 mais intensamente que HMB-45. O nevo azul de células fusiformes expressa fortemente tanto S-100 quanto HMB-45.

WANG¹⁸, em 1990, estudou 27 casos de melanoplasia da cavidade oral clínico-patologicamente e imuno-histoquimicamente. A relação entre melanoplasia e melanoma foi discutida. O termo melanoplásico, segundo o autor, deve ser usado somente para as lesões em que o aspecto clínico é considerado com características histológicas normais. Entre os 27 casos examinados, 74,07% ocorreram no lábio especialmente inferior. Em geral, a lesão do lábio é benigna. Porém, quando a melanoplasia ocorreu no palato e gengiva com aumento de células claras no epitélio e positividade para proteína S-100, com grande número de melanófagos na porção profunda da lâmina própria há um risco grande de transformação maligna, segundo o autor.

No que concerne a patologia da glândulas salivares, a multiplicidade dos aspectos histológicos exibidos pelas neoplasias das mesmas tem feito com que as técnicas imuno-histoquímicas sejam largamente utilizadas.

A variedade dos aspectos histológicos tem sido atribuída à presença da célula mioepitelial nestas glândulas, pois as neoplasias de pâncreas não apresentam esta célula e não exibem tal variação morfológica.

Entre os tumores de glândulas salivares, especial interesse tem sido dispensado ao adenoma pleomórfico, pois além de ser o tumor mais freqüente de glândulas salivares, apresenta aspecto histológico peculiar e permanece incerta sua histogênese.

SOUZA & ARAÚJO¹⁴, estudaram 51 casos de adenomas pleomórficos de glândulas salivares menores usando para reação imuno-histoquímica três anticorpos: a antiqueratina, vimentina e proteína S-100.

Os resultados obtidos mostraram que a vimentina, com exceção da célula luminal dos espaços tubulares esteve presente em todos os tipos celulares observados no adenoma pleomórfico, não sendo encontrada na célula mioepitelial normal.

A proteína S-100, embora não apresentando marcação consistente, mostrou-se útil na diferenciação entre a célula mioepitelial e o estroma colagênico ou fibroso do fibroblasto. A queratina utilizada (PM 45-55 kd) é também um bom marcador de célula mioepitelial modificada e da célula luminal.

Segundo os autores, embora a vimentina não seja indicada como marcador de tumores de origem mesenquimal sua presença na célula mioepitelial não invalida a histogênese epitelial do tumor, mas sim indica metaplasia mesenquimal, como também proposto por YAMADA et al.¹⁹.

Em outra análise de oitenta e nove tumores benignos de glândulas salivares, ARAÚJO et al.² demonstraram que a queratina é um bom marcador de célula luminal, a vimentina é muito importante para a identificação da célula mioepitelial tumoral enquanto a marcação pela proteína S-100 é variável.

Estudos também realizados por ARAÚJO et al.¹, em 67 tumores malignos de glândulas salivares utilizando-se anticorpo para queratina, vimentina e proteína S-100 mostraram que a queratina estava presente em todos os tumores estudados, enquanto a vimentina no carcinoma adenóide cístico, no adenocarcinoma polimorfo de baixa malignidade, no carcinoma epitelial-mio-epitelial e carcinoma em adenoma pleomórfico.

CARVALHO et al.⁴, analisaram 6 casos de adenocarcinoma de glândulas salivares menores de baixo grau de malignidade usando a vimentina, queratina e proteína S-100 concluindo que essas neoplasias exibem dois tipos de células neoplásicas: mioepitelial e luminal. Células com aspectos intermediários entre esses dois tipos estavam presentes, indicando uma possível conversão de células luminiais em mioepiteliais.

MURASE et al.¹⁰, estudaram a presença de proteína S-100 em células de Langerhans de tumores odontogênicos e cistos. A imuno-histoquímica demonstrou que de 71 casos de tumor odontogênico epitelial, foram positivos 11 casos, de 40 casos de cistos radiculares, 22 foram positivos e de 28 cistos foliculares, 3 casos.

O autor estabeleceu forte correlação entre a presença de proteína S-100 com alto grau de infiltração inflamatória nas lesões.

CONCLUSÃO

O exame da literatura sobre o emprego da imuno-histoquímica em patologia oral comprova a sua diversificação e utilização nos mais variados campos.

Espera-se que no futuro, além de permitir um aprimoramento das classificações dos vários processos patológicos, a imuno-histoquímica contribua cada vez mais para o aparecimento de métodos preventivos, para o diagnóstico preciso com prognóstico mais favorável, para o tratamento e a terapêutica das doenças que afetam a cavidade oral.

SUMMARY

Immunohistochemistry: applications in oral pathology

The present review article, is destined to professional from health area, in particular odontologists. It affords a view of application of immunohistochemical methods in oral pathology which have been used more and more in research and oncologic diagnosis.

Keywords: *Immunohistochemistry, oral pathology, antigens.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAÚJO, V.C., SOUZA, S.O.M., JAEGER, R. G., ARAÚJO, H.S. Immuno-histochemical study of malignant salivary gland tumors: an analysis of 67 cases. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v.5, n.1, p.37-42, 1991.
2. _____, NUNES, F.O., ARAÚJO, N.S. Immuno-histochemical analysis of 89 benign salivary gland tumors. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v.5, n.1, p.1-6, 1991.
3. CALICH, V.L.G.S., VAZ, C.A.C. *Imunologia básica*. São Paulo : Arte Médicas, 1991. p.167-72.
4. CARVALHO, Y.R., NOGUEIRA, T.O., SOUZA, S.O.M., ARAÚJO, V.C. Adeno carcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade: estudo ultra estrutural de imuno-histoquímica. *Revista de Odontologia da UNESP*, Marília, v.22, n.1, p.19-29, 1993.
5. COONS, A.H., CREECH, H.S., JONES, R.N. Immunohistological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology*, New York, v.47, p.200-202, 1941.
6. DENK, H. Immunohistochemical methods for the demonstration of tumor makers. In: SEIFERT, G., BERRY C.L., GRUHDMAN, E. *Morphological tumor markers: general aspects and diagnostic relevance*. Berlin : Springer Verlag, 1987. p.47-69.
7. GATTER, K. C., MASON, O.Y., HEYDERMAN, E., ISSACSON, P.C. Which antibodies for diagnostic pathology? *Histopathology*, Oxford, v.11, p.661-664, 1987.
8. GAZIT, D., DANIELS, T.E. Oral melanocytic lesion: differences in expression of HMB-45 and S-100 antigens in round and spindle cells of ABC and benign lesions. *Journal of Oral Pathology and Medical*, Copenhagen, v.23, n.2, p.60-64, 1994.
9. HSU, S.M., RAINEL, L., FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison of ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, New York, v.29, p.577, 1981.
10. MURASE, N., TATEMOTO, Y., IWAI, Y., OKADA, Y., MORI, M. Langerhans cells in odontogenic tumours and cyst as detected by S-100 protein immunohistochemistry. *Basic and Applied Histochemistry*, Milano, v.34, n.2, p.135-141, 1990.
11. NISHIOKA, H., HIASA, Y., HAYASHI, L., KITAHORI, Y., KONISHI, N., SUGIMURA, M. Immunohistochemical detection of p-53 oncoprotein in human oral squamous cell carcinomas and leucoplakias: comparison with proliferating cell nuclear antigen staining and correlation with clinico pathological findings. *Oncology*, Basel, v.50, n.6, p.426-429, 1993.
12. OGDEN, G.R., COWPE, S.G., CHISHOLM, O.M., LANE, D.P. Immunostaining as a marker for oral cancer diagnostic citopathology: preliminary report. *Cito Pathology*, Dundee, UK, v.5, n.1, p.47-53, 1994.
13. SCHIMITT, F.C., KIMARD, P.A., CAMPOS, P.F., BACHI, C.E. Contribuição ao estudo imuno-histoquímico para o diagnóstico anátomo patológico. *Revista do Hospital das Clínicas*, São Paulo. v.47, n.1, p.1-4, 1992.
14. SOUZA, S.O.M., ARAÚJO, V.C. Estudo morfológico e imuno-histoquímico do adenoma pleomórfico de glândula salivar menor. *Revista da Pós-Graduação da USP*. São Paulo, v.1, n.2, p.26-36, 1994.
15. STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H., CUCULIS, J.S. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in the identification of spirochetes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, New York, v.18, p.315, 1970.
16. TALMAGE, D.W. História da imunologia. In: STITES, P., STERN, A, I. *Imunologia básica*. Rio de Janeiro : R.S. Prentice/Hall do Brasil, 1992. p.1-6.
17. VASSALO, J. Avanços técnicos no diagnóstico histopatológico das neoplasias: imuno-histoquímica. *Revista UNICAMP*, Campinas, v.4, n.1, p.31-34, 1993.
18. WANG, I. Melanoplasia of the oral mucosa. *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih*, Beijing, v.25, n.1, p.2-4, 1990.
19. YAMADA, K., SHINOHARA, H., TAKAI, Y. Monoclonal antibody-detected vimentin distribution in pleomorphic adenomas of salivary glands. *Journal of Oral Pathology*, Copenhagen, v.17, p.348-353, 1988.

Recebido para publicação em 22 de agosto e aceito em 26 de setembro de 1995.