

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

**REVISÃO DE TÉCNICAS DE IMUNOHISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA PARA
DETECÇÃO DE HSP70 CÓCLEAR¹
ENZYMATIC IMMUNOHYSOCHEMICAL TECHNIQUE FOR THE
DETECTION OF HSP70 IN COCHLEA**

**Bruna Letícia Endl Bilibio², Samara Nicole Friske³, Marcos Soares⁴, Thiago
Gomes Heck⁵**

¹ Trabalho de pesquisa realizado pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Departamento de Ciências da Vida - DCVida, UNIJUI.

² Acadêmica do Curso de Nutrição - UNIJUI, Bolsista PIBITI/UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF

³ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - UNIJUI, Bolsista PIBITI/CNPq, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF

⁴ Docente do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI, doutorando em Distúrbios da Comunicação Humana-UFSM

⁵ Docente do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI - Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUI

INTRODUÇÃO

A perda auditiva é a mais prevalente é a desordem sensorial crescendo acentuadamente a nível mundial. A perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR) é a segunda maior causa de dano auditivo mundial. Além dos impactos na saúde pública, há também grandes impactos na saúde individual, especialmente referente a comunicação entre as pessoas. (WHO, 2017).

A PAIR ocorre por estresse que danifica células ciliares da cóclea. Neste sentido, a atuação proteínas com ação citoprotetora, como as proteínas do choque térmico de 70kDa (Heat Shock Proteins - HSP70), podem atuar protegendo a audição (MATHEW; MORIMOTO, 1998; YOSHIDA, N.; KRISTIANSEN, A.; LIBERMAN, M. C, 1999)

A imunohistoquímica (IHQ) é uma técnica utilizada diagnóstico de diferentes doenças que visa identificar proteínas específicas através de reações antígeno-anticorpo (Ag-AC) e a seguir, identificação específica por coloração. (RAMOS-VARA, BEISSENHERZ, 2000; FERRO, 2013). O objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão sobre a IHC utilizada para identificar a expressão de HSP70 no tecido coclear.

METODOLOGIA

Este estudo é uma revisão integrativa da literatura sobre a técnica de IHQ. Para o levantamento da literatura foi realizada a busca nas seguintes bases de dados: The Scientific Electronic Library Online - SciELO, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

Saúde (LILACS), Periódicos CAPES, e pesquisas locais na Biblioteca Mario Osorio Marques da UNIJUI. Foram utilizados, os seguintes descritores e suas combinações nas línguas portuguesa e inglesa: “Imunohistoquímica”, “Método”, “Cóclea”, “Perda da audição” e “Exposição ao ruído”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição ao ruído leva a uma intensa atividade metabólica na cóclea sendo responsável por levar a um quadro de estresse oxidativo, podendo ocasionar danos considerados transitório ou premente, dependendo do grau e tempo de exposição ao ruído. (HENDERSON et al., 2006). Portanto, os estudos geralmente relacionam a expressão de HSP70, considerado um fator de proteção ao dano coclear, com dados sobre estresse oxidativo e inflamação. (YOSHIDA, N.; KRISTIANSEN, A.; LIBERMAN, M. C, 1999; HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011).

A IHQ pode ser usada para poder visualizar a intensidade de estresse celular pela quantificação da expressão tecidual/celular de HSP70 no tecido coclear (MAHALE, A. et al; 2017). A IHQ visa identificar proteínas específicas através de reações antígeno-anticorpo (Ag-AC) através da coloração. Contudo, ao conjugar um anticorpo a um corante fluorescente aumenta a sensibilidade de detecção, o que representa grande avanço na técnica (FERRO, 2013). Portanto, são empregados dois tipos de métodos na IHQ: enzimático e fluorescência. (SALLES, et al., 2009)

Na técnica imunoenzimática por fluorescência, anticorpos são acoplados a chamados fluorocromos. Tais fluorocromos sofrem processo de exposição à luz ultravioleta, emitindo espectros de luz visível, observada de forma específica por meio de um microscópio de fluorescência. (FERRO, 2013)

O método enzimático é o método de mais comum uso, pois permite principalmente, a visualização em microscópio óptico. Através desse método é possível visualizar a estrutura geral do tecido e a marcação da IHQ. (DARKO, 2009; FERRO, 2013)

Por meio da ação enzimática, é possível obter produtos finais coloridos a partir de cromogênios incolores. Entretanto, a coloração varia de acordo com o tipo de enzima e substrato utilizados. As enzimas mais utilizadas são a *Horseradish Peroxidase - HRP*; a *Fosfatase Alcalina (Calf intestine Alkaline Phosphatase)*; e *Glucose Oxidase (Aspergillus niger)* (FERRO, 2013)

A enzima mais utilizada é a *Horseradish Peroxidase* ou HRP, que é obtida da raiz do rábano (*Armoracia rusticana*). (O’LEARY TJ, BECKER, FRISMAN DM; 2003). A HRP oxida indiretamente os cromogênios ao reagir com o peróxido de hidrogênio. Os cromogênios utilizados são substâncias que na sua forma oxidada são coloridas e estáveis, conferindo cor ao local da reação. A intensidade da coloração depende dos procedimentos de coloração usados além o conteúdo de proteína em si. (UMEMURA et al, 2004). Como o conteúdo de HSP70 em células diante de situações de estresse pode chegar até 5% das proteínas totais (HECK et al, 2011), geralmente o método colorimétrico é suficiente para detecção destas proteínas.

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

Para haver reação entre o antígeno e o anticorpo em materiais fixados por aldeídos é necessário desmascarar os antígenos, desfazendo as pontes intermoleculares formadas durante a fixação. Com esse objetivo, utiliza-se um procedimento denominado recuperação antigênica. Existem diversos mecanismos para se recuperar os antígenos em um tecido. A escolha do método ideal depende do tipo de tecido a ser analisado e da prática do laboratório. A técnica serve para desmascarar epítomos possibilitando restaurar a conformação de epítomos de interesse, para a adesão de anticorpos primários nas estruturas teciduais e possível interação. (MOLINARO, CAPUTO, 2010; FERRO, 2013)

Outro elemento capaz de causar reações inespecíficas é a peroxidase endógena tecidual. No método enzimático, o substrato cromógeno tende a reagir tanto com a peroxidase ligada ao anticorpo da reação quanto com a peroxidase tecidual. O bloqueio da peroxidase endógena é realizado utilizando água oxigenada a 3%, então dilui-se o anticorpo primário em solução albumina a 1%, incubam-se o anticorpo primário, em câmara úmida, em overnight por refrigeração a 4°C. 38. Para avaliação da HSP70, as lâminas são tratadas com anticorpo monoclonal primário anti-HSP70 na concentração 1:500. (MOLINARO, CAPUTO, 2010)

Após o tempo de incubação as lâminas são então mergulhadas em tampão PBS, tampão de lavagem sendo que as lâminas são lavadas 2x 5 min. Posteriormente, adiciona-se o anticorpo secundário marcado com peroxidase 1:100 por 2h em câmara úmida por 30 minutos. Ao chegar no fim o tempo de incubação é realizado em temperatura ambiente e novamente lavadas em PBS 2x 5min. Por fim, é adicionado o substrato cromógeno, diaminobenzina (DAB), 3,3' - diaminobenzidina tetrahidroclorato) 0,1% por 10 minutos realizando mais uma lavagem em água corrente e contra corado com hematoxilina de Harrys e montadas para visualização em microscópio óptico. (CAMBRUZZI, E. *et al*, 2011)

A colocação marrom do DAB é separada da hematoxilina pela técnica de deconvolução de cor e a intensidade pelo número de pixels avaliará quantitativamente a intensidade de HSP70 nas cócleas, analisadas pelo software gratuito ImageJ® (VARGHESE *et al.*, 2014; MAHALE *et al.*, 2017).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A imunohistoquímica se baseia na capacidade de atração de substâncias aos anticorpos, que quando interagem, possibilitam identificação molecular de elementos teciduais em um microscópio comum. Com o propósito de identificar alguns elementos teciduais é preciso reconhecer proteínas específicas. Para reconhecer a HSP70 a técnica de imunohistoquímica podem ser utilizada, sendo uma técnica que pode auxiliar no maior entendimento dos processos fisiopatológicos envolvidos na PAIR.

Palavras-chave: imunohistoquímica; perda auditiva; proteína de choque térmico;

Keywords: immunohistochemistry; Hearing Loss; heat shock protein;

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

REFERÊNCIAS

CAMBRUZZI, E. *et al.* **Avaliação imuno-histoquímica de 100 casos de metástases encefálicas e correlação com o sítio primário do tumor.** Rev. Bras. Patol., v. 47, n. 1, p. 57 - 64, 2011.

DAKO. **Immunohistochemical staining methods.** 5a edição. (Kumar G, Rudbeck L, eds.). Carpinteria: Dako; 2009.

FERRO, A. B. Imuno-histoquímica. Lisboa. 2013. 138f. **Dissertação (Licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica)**, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Lisboa, 2013.

HECK, T. G.; SCHÖLER, C. M.; DE BITTENCOURT, P. I. H. **HSP70 expression: Does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain?** Cell Biochemistry and Function, v. 29, n. January, p. 215-226, 2011.

HENDERSON, D. *et al.* **The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss.** Ear and hearing, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2006.

MATHEW, A. N. U.; MORIMOTO, Richard I. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, n. 1, p. 99-111, 1998.

MAHALE, A. *et al.* **Histopathologic and immunohistochemical features of capsular tissue around failed Ahmed glaucoma valves.** PLOS ONE, v. 12, n. 11, p. e0187506, 9 nov. 2017.

MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. v. 2. Cap 3.

O'LEARY TJ, BECKER, FRISMAN DM. **Advanced diagnostic methods in pathology: principles, practice, and protocols.** Philadelphia: W.B. Saunders; 2003.

RAMOS-VARA, José A.; BEISSENHERZ, Marilyn E. **Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 12, n. 4, p. 307-311, 2000.

SALLES, M. A. *et al.* **Contribution of immunohistochemistry to the assessment of prognostic and predictive factors of breast cancer and to the diagnosis of mammary lesions.** Rev. Bras. Patol., v. 45, n. 3, p. 213 - 222, 2009.

UMEMURA S, ITOH J, ITOH H, SERIZAWA A, SAITO Y, SUZUKI Y, ET AL. **Immu-**

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

nohistochemical evaluation of hormone receptors in breast cancer: which scoring system is suitable for highly sensitive procedures? Appl Immunohistochem 2004;12:8-13.

VARGHESE, F. et al. IHC Profiler: **An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples.** PLoS ONE, v. 9, n. 5, p. e96801, 6 maio 2014.

YOSHIDA, N.; KRISTIANSEN, A.; LIBERMAN, M. C. **Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice.** The Journal of neuroscience, v. 19, n. 22, p. 10116-10124, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Deafness and Hearing Loss.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>>. Acesso em: 29 maio. 2017.