

## UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ANTICORPOS NÃO MARCADOS PEROXIDASE (PAP) NA DETECÇÃO DO ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE DA HEPATITE B EM TECIDO HEPÁTICO \*

Venâncio Avancini Ferreira ALVES \*\*  
Carlos Floriano de MORAIS \*\*  
Raimunda Telma de Macedo SANTOS \*\*\*  
Augusta Kiyomi TAKEDA \*\*\*  
Luís Carlos da Costa GAYOTTO \*\*

RIALAS/507

ALVES, V.A.F.; MORAIS, C.F.; SANTOS, R.T.M.; TAKEDA, A.K. & GAYOTTO, L.C.C. — Utilização da técnica de anticorpos não marcados peroxidase (PAP) na detecção do antígeno de superfície da hepatite B em tecido hepático. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40(2):101-106, 1980.

**RESUMO:** Foi utilizada a técnica de anticorpos não marcados peroxidase-antiperoxidase em fragmentos de tecido hepático para a detecção de antígeno de superfície da hepatite B. Em confronto com a imunofluorescência, esta reação apresenta as vantagens de aplicabilidade em tecidos fixados e emblocados rotineiramente, análise à microscopia óptica ou eletrônica, visualização de detalhes morfológicos do tecido por contracorantes, além de manutenção da reação por um tempo indefinido. A utilização, neste estudo, de arsenal imunológico totalmente produzido nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, é um importante passo para a aplicabilidade deste método na rotina diagnóstica, em nosso meio.

**DESCRITORES:** coloração de tecido hepático, técnica imunocitoquímica; antígenos de superfície da hepatite B; hepatite B, antígenos; antígeno Austrália.

### INTRODUÇÃO

As técnicas imunoenzimáticas<sup>10</sup> introduzidas nos anos 60, com fundamentos teóricos semelhantes aos da imunofluorescência<sup>4</sup>, apresentam as vantagens de: a) poderem ser empregadas em tecidos fixados e emblocados rotineiramente, não requerendo, portanto, o processo por congelamento; b) possibilitarem a visualização da reação nos tecidos através tanto da microscopia óptica como da eletrônica; c) manterem detalhes morfológicos, podendo ser o tecido contra-corado por outros métodos; d) permanecer o material corado por períodos mais longos.

STERNBERGER<sup>14, 15</sup> introduziu a técnica de "anticorpos não marcados", utilizando o complexo peroxidase-antiperoxidase, o qual consiste na aplicação de anticorpos primários específicos produzidos em coelhos, adicionando a estes o soro de bode anti-IgG de coelho, em excesso relativo. Utilizando o poder antigênico da peroxidase, preparou o complexo peroxidase-antiperoxidase (PAP), obtido de coelho. Como o soro de bode anti-IgG de coelho tem dois sítios de ligação e está em excesso, liga-se tanto ao anticorpo primário como ao complexo PAP. O substrato cromogênico desta reação é a diaminobenzidina que sofre peroxidação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença da peroxidase.

\* Realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP.

\*\*\* Da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

Esta técnica proporcionou grande aumento da sensibilidade da reação<sup>1, 5, 7, 15, 16</sup>, havendo até autores que obtiveram sensibilidade superior à do radioimunoensaio<sup>8</sup>. Sua aplicabilidade prática é vertiginosamente crescente, sendo atualmente empregada na visualização de agentes etiológicos de doenças infecto-parasitárias, bem como de seus antígenos<sup>3, 6, 12, 15</sup>, de auto-anticorpos em doenças auto-imunes<sup>9</sup> e, em larga escala, na histopatologia de tumores produtores de hormônios, com morfologia inconclusiva<sup>2, 5, 17</sup>.

No Brasil, há relato do emprego deste método<sup>12</sup> mas, por ser utilizado arsenal imunológico importado, não traz perspectivas em procedimentos diagnósticos de rotina.

O presente trabalho tem por finalidade apresentar os resultados da aplicação do complexo PAP na pesquisa do antígeno de superfície da hepatite B (AgHB<sub>s</sub>), em fragmentos de tecido hepático fixado em formol e emblocado em parafina, com arsenal imunológico totalmente produzido nos laboratórios de imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

## MATERIAL

a) *Tecido hepático*: 64 lâminas de fragmentos de tecido hepático, obtidos em necropsia de paciente portador de hepatite crônica, em fase cirrótica, com AgHB<sub>s</sub> previamente detectado no soro, mediante reação de fixação de complemento e, no citoplasma de hepatócitos, pela reação histoquímica com a orceína de Shikata<sup>5, 13</sup>, utilizadas como controles positivos; 64 lâminas de fragmentos de tecido hepático, obtido em necropsia de paciente sem alterações óbvias à microscopia óptica, negativos para a reação pela orceína de Shikata<sup>13</sup>, utilizadas como controles negativos.

b) *Soro anti-HB<sub>s</sub>*: produzido em coelho, de título 1:128, por hemaglutinação passiva reversa.

c) *Antiimunoglobulina de coelho*: produzida em bode, título de anticorpos precipitantes por imunodifusão igual a 1:4.

d) *Complexo peroxidase-antiperoxidase (PAP)*: peroxidase\* conjugada à antiperoxidase obtida em coelho, segundo método descrito por STERNBERG<sup>14</sup>, com título de precipitação igual a 1:8.

e) *Soro não imune de bode*

f) *Solução reveladora*: diaminobenzidina, 25 mg; azida sódica, 31,5 mg; água oxigenada (130 vols.), 25 ml; tampão salino fosfatado (pH 7,2), 50 ml.

## MÉTODO

Utilizou-se o método descrito por STERNBERG<sup>14</sup>, modificado por BURNS<sup>1</sup>.

Foram necessárias algumas alterações nas diluições dos anti-soros:

a) Na incubação com anticorpos de coelho anti-HB<sub>s</sub>, foram usadas as diluições 1/5, 1/10 e 1/20.

b) Na incubação com anticorpo de bode anticoelho, foram usadas as diluições 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16.

c) Na incubação com complexo solúvel peroxidase-antiperoxidase, foram usadas as diluições 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16.

## RESULTADOS

O padrão "positivo" apresentou coloração castanho-escura, em padrão homogêneo, difuso, no citoplasma de agrupados de hepatócitos, poupando o núcleo, visível como um centro claro (figuras 1 e 2). Os demais hepatócitos células de Kupffer, ductos biliares, artérias, veias e hemácias, assim como o interstício, tomaram coloração "gelo", com minúsculos grânulos acastanhados, irregulares (artefato de técnica).

O padrão "negativo" apresentou coloração "gelo", difusa, havendo minúsculos grânulos acastanhados, irregulares.

Os resultados das 128 lâminas estudadas foram os seguintes:

a) 12 lâminas controle positivo incubadas com complexo PAP em diluição 1/2, conforme figura 3.

b) 12 lâminas controle positivo incubadas com complexo PAP em diluição 1/4, como demonstra a figura 4.

c) 24 lâminas controle positivo incubadas com complexo PAP em diluições 1/8 e 1/16 que resultaram *negativas*, independentemente de diluição do anti-HB<sub>s</sub> (1/5, 1/10 e 1/20) e do anticorpo bode anticoelho (1/2, 1/4, 1/8 e 1/16).

d) Todas as 64 lâminas controle-negativo resultaram *negativas*, independentemente da diluição dos anti-soros e anti-HB<sub>s</sub> e bode-anticoelho, bem como do complexo PAP.

e) 16 lâminas que receberam o PAP na diluição dos anti-soros e anti-HB<sub>s</sub> e bode-anticoelho foram suprimidas as etapas 2, 3 e 4 do método de STERNBERG<sup>14</sup>, que apresentaram resultados semelhantes aos das lâminas processadas com todas as etapas do método.

\* Peroxidase, tipo II, da Sigma Chemical Company, St. Louis, Ms., E.U.A.

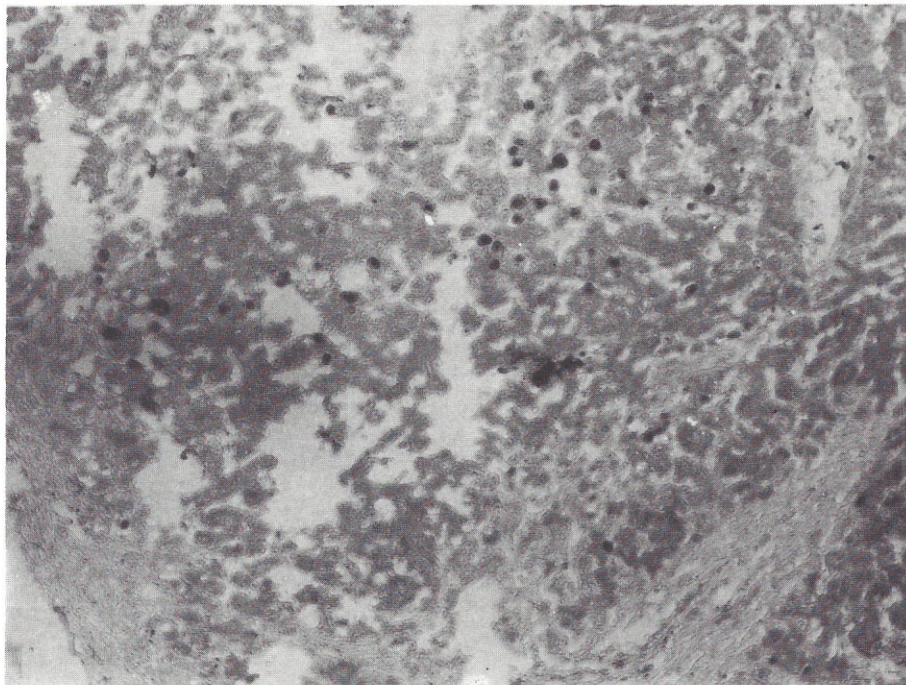


FIGURA 1 — O citoplasma de hepatócitos infectados com AgHB<sub>s</sub> toma coloração castanho-escura, difusa, enquanto o núcleo permanece como um 'centro claro, negativo'. Os demais hepatócitos e interstícios tomam coloração "Gelo". (PAP. 40 x)

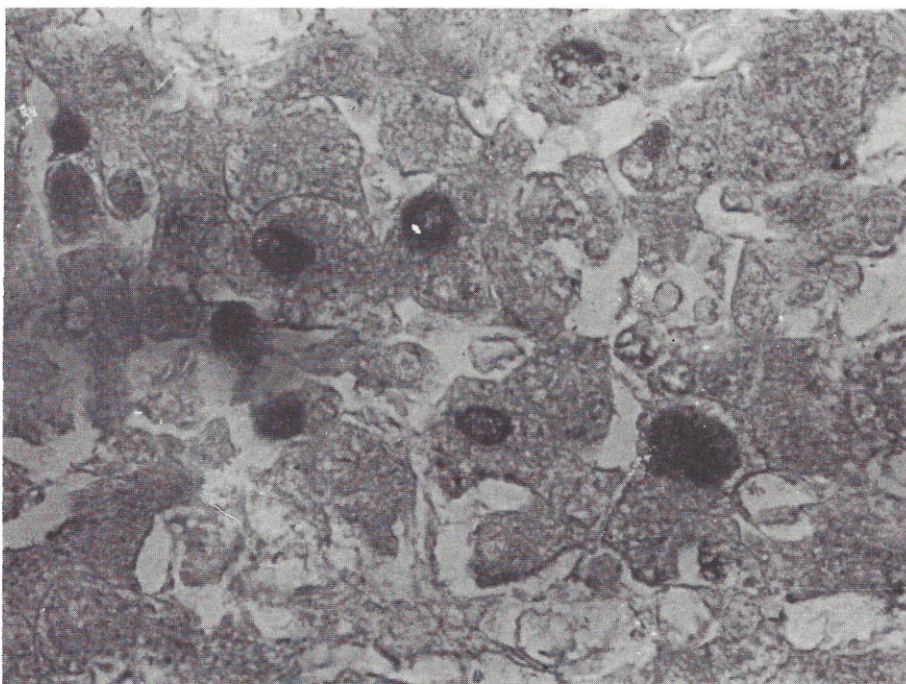


FIGURA 2 — Detalhe do mesmo tecido apresentado na figura 1 — O citoplasma dos hepatócitos com AgHB<sub>s</sub> é facilmente diferenciado das demais estruturas devido à coloração castanho-escura, difusa. (PAP. 140 x)

|                                       |      | Anticorpo bode anticoelho |     |     |      |
|---------------------------------------|------|---------------------------|-----|-----|------|
| Diluição                              |      | 1/2                       | 1/4 | 1/8 | 1/16 |
| Anticorpo coelho anti-HB <sub>s</sub> | 1/5  | —                         | —   | —   | —    |
|                                       | 1/10 | +                         | +   | —   | —    |
|                                       | 1/20 | +                         | +   | —   | —    |

(—) = negativo.

(+) = positivo.

FIGURA 3 — Resultado das lâminas de controle positivo submetidas ao complexo PAP em diluição 1/2.

|                                       |      | Anticorpo bode anticoelho |     |     |      |
|---------------------------------------|------|---------------------------|-----|-----|------|
| Diluição                              |      | 1/2                       | 1/4 | 1/8 | 1/16 |
| Anticorpo coelho anti-HB <sub>s</sub> | 1/5  | —                         | —   | —   | —    |
|                                       | 1/10 | +                         | +   | —   | —    |
|                                       | 1/20 | +                         | +   | —   | —    |

(—) = negativo.

(+) = positivo.

FIGURA 4 — Resultado das lâminas de controle positivo submetidas ao complexo PAP em diluição 1/4.

## DISCUSSÃO

Os anticorpos produzidos no Instituto Adolfo Lutz apresentaram resultados iniciais que podem ser considerados satisfatórios, na detecção do antígeno de superfície da hepatite, em cortes de fígado obtidos de necropsia de paciente portador de cirrose por hepatite B. Foram eles anti-HB<sub>s</sub> e antiperoxidase, ambos produzidos em coelhos, assim como soro anticoelho, produzido em bode. Este último, como se sabe, reagindo com soro de coelho, permitiu a ligação do anticorpo anti-HB<sub>s</sub> com antiperoxidase (ambos imunoglobulinas de coelho). Desta maneira, a aplicação deste complexo imunológico ao tecido fez com que a reação de HB<sub>s</sub> do tecido com o anti-HB<sub>s</sub> trouxesse consigo também o complexo PAP capaz de reagir com a diaminobenzidina, corando os locais em que se encontra o antígeno no fígado.

Levando em consideração que, como já foi ressaltado, o soro de bode deve ao mesmo tempo ligar-se tanto ao anti-HB<sub>s</sub> como ao PAP, há necessidade de excesso relativo de soro de bode anticoelhos na reação, sem o qual o anti-HB<sub>s</sub> poderia consumir o soro antibode, sem efetivar a ligação desejada. Desta maneira, diluições aumentadas de soro de bode promoveriam um excesso relativo do anti-HB<sub>s</sub> e negatividade da reação.

Com efeito, o soro de bode anticoelho em diluições de 1:8 e 1:16 não repetiu a positividade obtida com as diluições de 1:2 e 1:4. De outra parte, como não poderia deixar de ser, sucedeu o inverso com o soro de coelho anti-HB<sub>s</sub>. Em diluições menores repetiu-se a condição de excesso relativo, que deixou de existir quando se aumentou a diluição: assim, em diluições de 1:5, a reação foi negativa, tornando-se positiva a 1:10 e 1:20.

De outra parte, deve ser ainda considerada a possibilidade de obtenção de títulos mais elevados de PAP, aumentando a sensibilidade do método.

As minúsculas granulações acastanhadas que apareceram em todas as lâminas repre-

sentam cristais insolúveis de diaminobenzidina, cuja presença não interferiu na identificação do AgHB<sub>s</sub>, enquanto a proporção dos hepatócitos corados, seu agrupamento em focos, bem como padrão intracitoplasmático difuso de distribuição do antígeno, poupando o núcleo, repete o referido na literatura<sup>1, 2, 3, 5, 6, 7, 13, 16</sup>.

Deve-se salientar que a utilização dos itens 2, 3 e 4 da técnica descrita por STERNBERGER<sup>15</sup>, que visam bloquear a atividade da peroxidase endógena, em nosso material pareceu dispensável, já que sua utilização não causou resultados falso-positivos, o que discorda da experiência de alguns autores<sup>7, 12, 14, 15, 16</sup>. Este fato poderia, em parte, estar relacionado com o tipo de tecido analisado, no caso o fígado, ou à incubação com xileno, o que poderia destruir a atividade da peroxidase endógena<sup>13</sup>.

## CONCLUSÕES

As vantagens da implantação do ensaio imunoenzimático em fragmentos teciduais, em nosso meio, são significativas: a) a técnica funciona na identificação do AgHB<sub>s</sub> em tecido hepático; b) torna desnecessária a utilização de reagentes imunológicos importados, permitindo sua aplicação em caráter de rotina; c) desde que se promova a produção de antiperoxidase em diferentes animais, para a obtenção de diferentes conjugados, poderão ser identificados antígenos microbianos, hormonais e tumorais; d) a aplicabilidade deste método, altamente sensível e específico, praticamente não terá limites, não só no campo da pesquisa, mas também no da rotina diagnóstica, especialmente na patologia cirúrgica.

## Agradecimentos

Agradecemos à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eosenir S. Sarno e à Dr.<sup>a</sup> Leila Maria Machado Vieira, do Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, pelas sugestões técnicas para este trabalho.

RIALA6/507

ALVES, V.A.F.; MORAIS, C.F.; SANTOS, R.T.M.; TAKEDA, A.K. & GAYOTTO, L.C.C. — Peroxidase — antiperoxidase unlabelled antibody technique (PAP) for the detection of hepatitis B surface antigen in hepatic tissue. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40(2):101-106, 1980.

**ABSTRACT:** Peroxidase — antiperoxidase unlabelled antibody technique on hepatic tissue sections was carried out for detection of hepatitis B surface antigen. This method demonstrated advantages over immunofluorescence, regarding to its utilization in fixed or in block tissue, in routine procedures, in optical or electronic microscopy, for visualization of detailed morphological tissue structures by selective staining and preparation of permanent records. This technique using all of the immunological materials prepared in our laboratory at Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil, is an important step for its suitability for use in diagnostic procedures.

**DESCRIPTORS:** staining, immunocytochemical technique for hepatic tissue; antigens, surface, hepatitis B; hepatitis B surface antigens; Australia antigens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BURNS, J. — Background staining and sensitivity of the unlabel antibody-enzyme PAP method. Comparison with the peroxidase-labelled antibody sandwich method using formalin-fixed paraffin embedded material. *Histochemistry*, 43:291-4, 1975.
2. CLAUSEN, P.P.; JACOBSEN, M.; JOHANSEN, P. & THOMMENSEN, N. — Immunohistochemical demonstration of intracellular immunoglobulin in formalin fixed, paraffin embedded sections, as staining method in diagnostic work. *Acta path. microbiol. scand.* (Section C), 87:307-12, 1979.
3. CLAUSEN, P.P. & TOMSEN P. — Demonstration of hepatitis B-surface antigen in liver biopsies. *Acta path. microbiol. scand.* (Section A), 86:383-8, 1978.
4. COONS, A.H.; CREECH, H.J. & JONES, R.N. — Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 47:200-2, 1941.
5. DE LELLIS, R.A.; STERNBERGER, L.A.; MANN, R.B.; BANKS, P.K. & NAKANE, P.K. — Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. *Am. J. clin. Path.*, 71: 483-8, 1979.
6. HUANG, S.N. — Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab. Invest.*, 33:88-95, 1975.
7. MESA-TEJADA, R.; PASCAL, R.R. & FENOGLIO, C.M. — Immunoperoxidase: a sensitive immunohistochemical technique as a "special stain" in the diagnostic pathology laboratory. *Human Pathol.*, 8:313-20, 1977.
8. MORIARTY, G.C.; MORIARTY, C.M. & STERNBERGER, L.A. — Ultrastructural immunocytochemistry with unlabeled antibodies and the peroxidase-antiperoxidase complex (PAP). A technique more sensitive than radioimmunoassay. *J. Histochem. Cytochem.*, 21:825-33, 1973.
9. MURPHY, W.M.; DEODHAR, S.D. & CAWLEY, L.P. — Use of horseradish peroxidase in identification of serum antibodies and immune complexes. *Clin. Chem.*, 19:370, 1973.
10. NAKANE, P.K. & PIERCE, G.B., JR. — Enzyme labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 14:929-38, 1967.
11. RITTER, H.B. & OLESON, J.J. — A peroxidase reaction in paraffin sections. *Arch. Path.*, 43:330-2, 1947.
12. SARNO, E.N.; GERECHT, D. & FONSECA, F.B. — Unlabelled antibody enzyme method for HB<sub>s</sub>Ag. in liver tissue: soluble horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase complex (PAP). *Rev. Bras. Med.*, 35:488-90, 1978.
13. SHIKATA, T.; UZAWA, T.; YOSHIWARA, N.; AKATSUKA, T. & YAMAZAKI, S. — Staining method of Australia antigen in paraffin section-detection of cytoplasmic inclusion bodies. *Jap. J. exp. Med.*, 44:25-36, 1974.
14. STERNBERGER, L. — *Immunochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey, Prentice Hall, 1974.
15. STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H., Jr.; CUCULIS, J.J. & MEYER, H.G. — 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.*, 18:315-33, 1970.
16. TAYLOR, C.R. — Immunoperoxidase techniques. Practical and theoretical aspects. *Arch. Path. Lab. Med.*, 102:113-21, 1978.
17. THUNG, S.N.; GERBER, M.A.; SARNO, E. & POPPER, H. — Distribution of five antigens in hepatocellular carcinoma. *Lab. Invest.*, 41:101, 1979.

Recebido para publicação em 12 de junho de 1980.