

CARACTERIZAÇÃO DE ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NA DOENÇA DE CROHN POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Palavras-Chave: Doença de Crohn; Estresse de Retículo endoplasmático; Imunohistoquímica

Autores(as):

Leonardo Sain Clair Assad Warrak, FCM – UNICAMP

Bruno Lima Rodrigues, FCM - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Raquel Franco Leal, FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória intestinal (DII) crônica que leva a uma produção abundante de citocinas inflamatórias. A superprodução de proteínas malformadas sobrecarrega o retículo endoplasmático (RE), levando a um estado de estresse (RE stress). Uma vez ativado o RE stress, ocorre a resposta de Proteínas Malformadas (UPR) que pode resultar em degradação de proteínas, autofagia e/ou apoptose. Estudos recentes têm ligado a ativação do RE stress à manutenção da DC. No entanto, não há estudos que realizem a caracterização do ER stress por meio da imuno-histoquímica.

OBJETIVO:

Avaliar, por meio da imuno-histoquímica, a modulação inflamatória na mucosa intestinal de pacientes com DC.

METODOLOGIA:

Amostras da mucosa intestinal de pacientes com DC foram coletadas por colonoscopia, após a aprovação do Comitê de Ética da Unicamp. O grupo controle foi composto por pacientes que realizaram colonoscopia por razões diferentes de doenças inflamatórias intestinais (DII). As biópsias foram incluídas em blocos de parafina para realizar o corte histológico. A avaliação da ativação do estresse do RE foi feita com o anticorpo Xbp-1 e ERN1 e a sinalização da UPR foi feita com o uso dos anticorpos GRP78, GRP94 e DDIT3. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp.

Tabela 1- Características clínicas e demográficas de pacientes incluídos no estudo.

GRUPO DE PACIENTES:	CTR	DC
Número de pacientes	7	8
Sexo (masculino/feminino)	3/4	1/6
Idade - (média - min/max)	38.5 anos (28-51)	51 anos (27 – 57)
Classificação de Montreal:		
Comportamento (B1/B2/B3)	-	2/6/2
Localização (L1/L2/L3/L4)	-	2/3/3/0
Tempo de DC (média – min/max)	-	13.5 anos (1 – 21)
CDEIS (média– min/max)	-	6.62 (0 – 22.1)
Medicações (número de pacientes)	-	Infliximab (1) Adalimumab (3) Azatioprine (5)

Imunohistoquímica:

Os blocos de mucosa intestinal incluídos em parafina de pacientes com doença de Crohn (CD) e do grupo controle foram cortados em seções de 4 µm. Após a desparafinação, a recuperação do antígeno foi realizada utilizando uma solução de tampão de citrato (pH 6,0) por 20 minutos a 95°C. A peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de peróxido de hidrogênio (3% H₂O₂ 10 vol), seguida de lavagens em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,4).

Os anticorpos primários foram diluídos em uma solução de albumina sérica bovina (BSA) a 1% (diluídos em PBS) e incubados a 4°C durante a noite. Os anticorpos utilizados foram: anti-fosfo-[Ser51] eIF2a (Abcam - ab32157, monoclonal de coelho), anti-Xbp-1 purificado (terminação COOH) (BioLegend – 555483, policlonal de coelho), GRP78 (Bioss Antibodies – bs-1219R, policlonal de coelho), GRP94 (Bioss Antibodies – bs-0194R, policlonal de coelho) e anti-DDIT3 (BioVision – A1674-100).

A detecção do sinal foi realizada com o uso de um sistema de detecção por imunoperoxidase (Vector Laboratories), seguido de incubação com solução de DAB (Dako). As lâminas foram então enxaguadas com água destilada, contra-coradas com hematoxilina, desidratadas com várias concentrações de álcool e montadas com meio de montagem (Dako). Fotomicrografias foram tiradas utilizando o microscópio Leica DM4500 e a câmera digital Leica DFC290 para microscopia com software de controle (Leica Microsystems, Wetzlar).

Análise Estatística:

A análise estatística foi realizada utilizando testes não paramétricos. Para avaliar a normalidade estatística, foi realizado o teste de Shapiro, e, uma vez estabelecida a normalidade, foram realizados o teste t e o teste de Mann-Whitney entre os grupos. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

- As imagens da Imuno-histoquímica mostraram que as vias PERK e IRE1 do estresse do ER estão ativadas nos pacientes com DC. Além disso, os resultados mostram novas informações sobre a localização dessa ativação, uma vez que proteínas relacionadas à UPR, como DDIT3, GRP78, e GRP94 foram encontradas não apenas em células epiteliais intestinais, mas também em células da lâmina própria de pacientes com DC.
- Com o objetivo de mostrar a ativação do estresse do RE, realizamos imuno-histoquímica (IHQ) na mucosa intestinal de pacientes com doença de Crohn (DC) e pacientes sem DII como grupo controle (conforme mostrado na Tabela 1). As imagens de IHQ revelaram imunorreatividade positiva para a expressão de p-eIF2 α em células epiteliais intestinais, bem como em células da lâmina própria de pacientes com DC.
- Um aumento na produção de chaperonas e indução de apoptose são resultados frequentemente observados após a ativação da UPR (resposta de proteínas mal dobradas). Portanto, também realizamos Imuno-histoquímica para DDIT3, GRP78 e GRP94. Como resultado, observamos imunorreatividade positiva para GRP78 e GRP94 em células epiteliais intestinais e células da lâmina própria de pacientes com DC, enquanto a imunorreatividade para DDIT3 foi observada apenas em células da lâmina própria da mucosa intestinal em pacientes com DC, enquanto no grupo controle, células positivas foram detectadas em epitélio e lâmina própria.

CONCLUSÃO:

Com as imagens da IHC, a localização e ativação de proteínas relacionadas à UPR, a via do estresse do RE na DC fica mais elucidada, podendo permitir futuramente, abordagens terapêuticas mais específicas e direcionadas ao tratamento de DC.