OTIMIZAÇÃO DO BIOMARCADOR PRAME PELA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA NO BRASIL

Germano, Andressa; Taccani, Alessandro; Leme, Gabriel; Lemes, Cássia

Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento - Grupo Erviegas - Brasil - Indaiatuba/SP

Introdução e Objetivo

A técnica de Imuno-histoquímica (IHQ) consiste na detecção de antígenos em tecidos baseado na revelação da reação antígeno anticorpo. Em 1961, Albert H Coons apresentou os primeiros anticorpos marcados por fluorescência. Através da IHQ é possível diferenciar neoplasias benignas de malignas, identificar os subtipos de tumores e indicar terapia alvo. Atualmente há diversas pesquisas para aprimoramento e descoberta de diversos polímeros para a técnica de IHQ. O PRAME, antígeno expresso preferencialmente em melanoma, é um alvo potencial para imunoterapia. PRAME faz parte da família de proteínas nucleares de melanoma reconhecidas por linfócitos T,[1] codificado por um gene de mesmo nome *PRAME* localizado na região cromossômica 22q11.22. A proteína PRAME é caracterizada como um inibidor dominante do receptor de ácido retinóico (AR), participando do bloqueio da proliferação celular, diferenciação ou apoptose induzida pelo AR. A superexpressão de PRAME em células tumorais confere uma vantagem de sobrevivência sobre as células normais, auxiliando na distinção entre nevos melanocíticos e melanomas. O objetivo do estudo foi padronizar o biomarcador PRAME clone EPR20330 por IHQ.

Metodologia

O bloco de parafina foi recortado para confecção de lâmina corada por Hematoxilina e Eosina (HE) para revisão (espessura de 3 micrômetros) por dois patologistas. Os demais cortes histológicos para a técnica de IHQ foram acondicionados em lâminas com carga positiva. Foram testados dois tampões de recuperação antigênica e dois sistemas de detecção (SD), as diluições testadas foram 1:150, 1:100, 1:80 e 1:50. Observou-se a incubação do PRAME (Master diagnóstica/EasyPath) clone EPR20330 por 30 minutos e 1 hora. Classificou-se a intensidade da marcação como ausente (0), fraco (1), médio (2), forte (3). Para a área de expressão do marcador no tecido considerou-se ausente (0), 1-10% (1), 11-50% (2), maior que 50% (3). Após classificação, estabeleceu-se o escore somando a intensidade com a porcentagem. Considerou-se positiva a marcação quando a soma foi maior ou igual a 3.

Resultados e Discussão

Foram realizadas 20 lâminas. Os testes dos tampões de recuperação antigênica Citrato foram ausentes de marcação com a incubação de PRAME por 30 minutos para os 2 SD. As lâminas recuperadas em EDTA apresentaram marcação média nas diluições 1:80 e 1:50, fraca na 1:100 e ausente 1:150 para os 2 SD por 30 minutos de incubação (Tabela 1). O melanoma é uma neoplasia agressiva cuja incidência está aumentando. São necessários novos marcadores que auxiliem na distinção entre lesões benignas e melanomas. Apesar do PRAME não ser expresso exclusivamente em melanomas pode ser útil na distinção entre nevos e melanomas[2,3]. A imunorreatividade do PRAME é nuclear, difusa e de difícil padronização (Figura 1). Dentre as principais dificuldades encontradas estão a complexidade de eliminar o fundo,

Os nossos achados demonstraram que PRAME não funcionou em pH baixo (Citrato). Obteve-se êxito utilizando EDTA, pH alto. Ao incubar 30 minutos a marcação não estava nítida, sendo assim aumentamos o tempo do PRAME para 1 hora e o restante seguiu-se conforme o protocolo do fabricante. O Melhor resultado foi PRAME com diluição 1:50 com 1 hora de incubação (Tabela 1), núcleos bem marcados com intensidade forte, expresso em mais de 50% das células do controle. O SD1 possui o diferencial enhancer que é um potencializador da marcação após o cromógeno DAB, os nossos resultados demonstraram que o SD1 associado ao maior tempo de incubação procedeu no resultado positivo. Outros estudos serão realizados em casos clínicos de melanoma e lesões benignas para validação do clone no Brasil.

Tabela 1. Padronização do PRAME - Clone EPR20330 por Imuno-histoquímica

Tampão	Fornecedor SD	1:150	1:100	1:80	1:50
Citrato SD1 30min	Master Diagnóstica/ EasyPath	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Citrato SD2 30 min	Biocare/ Grupo Erviegas	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
EDTA SD1 30 min	Master Diagnóstica/ EasyPath	Ausente	Fraca	Média	Média
EDTA SD2 30 min	Biocare/ Grupo Erviegas	Ausente	Fraca	Média	Média
EDTA SD1 1h	Master Diagnóstica/ EasyPath	Ausente	Fraca	Média	Forte

*** Recuperação antigênica - panela de pressão**

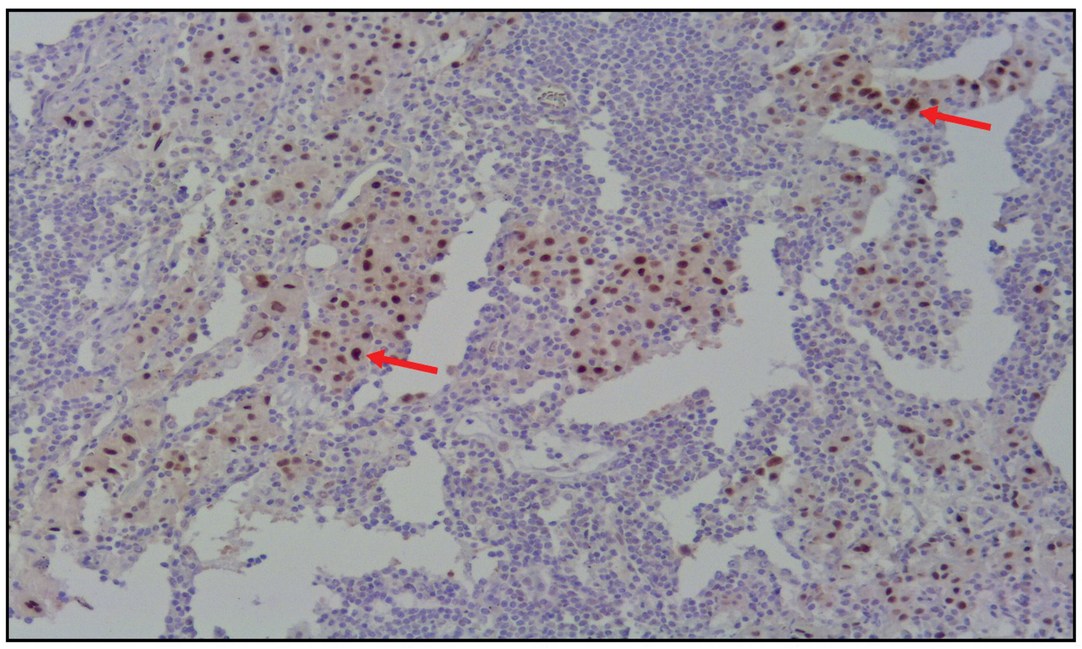

Figura 1. Corte histológico de Melanoma. Positividade de PRAME clone EPR20330 no aumento 200X. As setas indicam marcação nuclear, difusa.

Conclusão

O biomarcador PRAME clone EPR20330 foi padronizado/otimizado por IHQ em bloco controle de melanoma.

Referências Bibliográficas

1. Torres-Cabala C, Li-Ning-Tapia E, Hwu WJ. Pathology-based Biomarkers Useful for Clinical Decisions in Melanoma. Arch Med Res. 2020 Nov;51(8):827-838.
2. Lezcano C, Pulitzer M, Moy AP, Hollmann TJ, Jungbluth AA, Busam KJ. Immunohistochemistry for PRAME in the Distinction of Nodal Nevi From Metastatic Melanoma. Am J Surg Pathol. 2020 Apr;44(4):503-508.
3. Kline N, Menge TD, Hrycaj SM, Andea AA, Patel RM, Harms PW, Chan MP, Bresler SC. PRAME Expression in Challenging Dermal Melanocytic Neoplasms and Soft Tissue Tumors With Melanocytic Differentiation. Am J Dermatopathol. 2022 Jun 1;44(6):404-410.