

Valutazione istochimica della immunoreattività della perossidasi tiroidea e sua correlazione con l'attività biochimica



Ann. Ital. Chir., LXXIII, 3, 2002

F. Carlei, E. Perata*, M. Schietroma, T. Ventura**, G. Natuzzi*, M. Rossi***, G. Capperucci*, E. Lezoche****

Università degli Studi di L'Aquila
Divisione di Chirurgia Geriatrica (Dir. Prof. Francesco Carlei)
P.O. Anagni Asl FR
*U.O. Chirurgia Addominale e d'Urgenza
Primario Dott. Gino Capperucci
Ospedale San Salvatore-L'Aquila
**Servizio di Anatomia e Istologia Patologica
***Cattedra di Chirurgia Endoscopica
Titolare: Prof. Maria Antonietta Pistoia
Università degli Studi di Ancona
****Cattedra di Chirurgia Generale I
Dir.: Prof. Emanuele Lezoche

Introduzione

La biosintesi degli ormoni tiroidei nella tiroide normale dipende in larga misura dalla attività della perossidasi (1). Inoltre la quantità di perossidasi contenuta nella tiroide è stata valutata in diverse patologie della tiroide grazie a metodiche biochimiche, istochimiche, ultrastrutturali ed immunoistochimiche (2-5).

La maggior parte di queste metodiche richiede tessuto tiroideo fresco che dovrà essere sottoposto a specifici trattamenti non sempre disponibili in tutti gli ospedali, inoltre queste metodiche non consentono la realizzazione di studi retrospettivi.

Procedure di fissazione ed inclusione sono certamente responsabili della inibizione della attività biologica della perossidasi, sebbene la sua molecola mantenga specifiche caratteristiche immunoistochimiche (5).

La ricerca immunoistochimica della perossidasi tiroidea, su campioni di tiroide trattati in maniera standardizzata, è stata precedentemente effettuata, sebbene valutazioni comparative di risultati ottenuti con l'immunoistochimica su campioni inclusi in paraffina con una valutazione comparativa su campioni adiacenti non siano mai state effettuate.

In questo studio si sono usati anticorpi disponibili in commercio al fine di evidenziare una immunoreattività simil-perossidasi su campioni di tiroide trattati per isto-

Abstract

IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSESSMENT OF PEROXIDASE-LIKE IMMUNOREACTIVITY IN THE THYROID GLAND AND ITS CORRELATION WITH BIOCHEMICAL ASSAY

Background: Peroxidase content has been recently evaluated in normal thyroid and in different thyroid disorders by biochemical, histochemical, ultrastructural and immunocytochemical methods. Nevertheless immunocytochemical detection of thyroid peroxidase in thyroid samples conventionally processed for histology has never been done using a commercially available antibody, neither its correlation with the biochemical activity on adjacent samples.

Methods: In this study we have analyzed normal thyroid tissue (3 patients), follicular adenoma (2 patients) and multinodular goiter (2 patients) conventionally processed for histology and stained by immunocytochemistry (Avidin Biotin System) using a polyclonal (rabbit) antibody for horseradish peroxidase (Serotec). Biochemical assay was performed on adjacent samples according to Hosoya method.

Results: Normal thyroid showed peroxidase immunoreactivity in the majority of follicular cells; neoplastic cells of adenomas were variably stained. Biochemical assay showed positive correlation with ICC ranging from 20.4 mg/mg/prot a in multinodular goiter to 42.12 in normal thyroid, up to 122 of follicular adenoma.

Conclusions: Peroxidase content in the thyroid gland may be of clinical interest in several thyroid diseases, and in this study we have demonstrated that thyroid peroxidase can be detected by ICC in routinely processed thyroid samples using a commercially available antibody.

Key words: Thyroid gland, Peroxidase Immunohistochemistry.

logia con metodica standard e successivamente è stata effettuata una comparazione con analisi condotta su campioni adiacenti.

Materiale e metodo

Tessuto tiroideo fresco è stato ottenuto su 5 pazienti che dovevano essere sottoposti a tiroidectomia. Tessuto tiroideo normale è stato ottenuto da tre pazienti con ade-

noma tiroideo e due pazienti con gozzo multinodulare. Tutti i campioni di circa 1 cm sono stati suddivisi in due parti uguali, la prima per essere studiata dal punto di vista istologico ed immunoistochimico. La seconda per una valutazione biochimica.

ISTOLOGIA ED IMMUNOISTOCHEMICA

Tutti i campioni sono stati fissati in formalina al 4% per 24 ore, lavati deidratati ed inclusi in paraffina. Sono state effettuate sezioni di 4 micron convenzionalmente colorate con ematossilina-eosina, mentre le sezioni adiacenti sono state montate su vetrini precedentemente trattati con poly-L-lysina e trattati per immunoistochimica utilizzando il metodo della extravidina-biotina perossidasi (6). La perossidasi endogena è stata neutralizzata da H₂O₂ 30 vol. all'1%. L'anticorpo policlonale primario (da coniglio) diretto contro la perossidasi equina è stato diluito 1/20. I siti immunoreattivi sono stati visualizzati dal complesso extravidinaperossidasi coniugata seguita da 3-3 diaminobenzidina (25 mg/100 ml di fosfato a pH 7,25).

Le sezioni sono state colorate con ematossilina diluita e osservate con microscopio Leitz dotato di macchina fotografica. L'intensità di colorazione delle cellule follicolari e tumorali è stata classificata in tre gradi:

- 1) negativo con meno del 25% di cellule positive;
- 2) moderato con una percentuale compresa tra il 20% e il 75% di cellule positive;
- 3) intenso con più del 75% di cellule positive.

CONTROLLI

I controlli sono stati effettuati non usando l'antisiero primario o sostituendolo con un siero non immune di coniglio. Un controllo addizionale è stato effettuato incubando le sezioni con 3-diaminobenzidina. Tutti i controlli hanno dato risultati negativi supportando perciò la tesi della specificità della immunoreazione.

VALUTAZIONE BIOCHIMICA

La valutazione biochimica è stata effettuata con metodi di Hosoya (2). Il tessuto tiroideo è stato omogeneizzato (1 g di tessuto in 5 ml di Tris-HCl 0:02 M a pH 7.4), centrifugato 2 volte a 700 xg per 10 minuti, il supernatante è stato combinato e centrifugato a 4500 xg per 2 ore.

Il precipitato è stato incubato con deoxicolato 0,5%, centrifugato a 1500 rpm per 15 minuti. L'attività perossidasi è stata determinata con l'ossidazione del guaiacol in accordo con la metodica di Hosoya e il contenuto in proteine è stato valutato con il test BCA nel supernatante.

Tab. I - CORRELAZIONE TRA INTENSITÀ DI COLORAZIONE E LA VALUTAZIONE BIOCHIMICA DELL'ATTIVITÀ DELLA PEROSSIDASI

Istologia	Intensità di colorazione			Attività della perossidasi (mg/mg/prot)
	Negativa	Moderata	Intensa	
Normale		x		42.12
Tiroide		x		49.92
Tiroide		x		42.23
Follicolare				
Adenoma			x	122
Adenoma			x	129.5
Multinodulare				
Gozzo		x		35.7
Gozzo				20.4

Risultati

I Campioni di tessuto tiroideo normale hanno mostrato una immunoreattività similperossidasi nella maggior parte delle cellule follicolari fortemente evidenziabile a livello citoplasmatico. Anche le cellule neoplastiche degli adenomi erano fortemente positive, mentre le cellule follicolari di gozzo multinodulare erano variamente colorate. La correlazione tra l'intensità della colorazione e la valutazione biochimica dell'attività della perossidasi è mostrata in Tabella I.

Discussione e commento

In questo studio noi abbiamo dimostrato che la perossidasi tiroidea può essere evidenziata da metodi immunoistochimici in campioni di tessuto trattati routinariamente per istologia usando un anticorpo policlonale disponibile in commercio e diretto contro la perossidasi equina.

Infatti precedenti studi hanno rilevato che la perossidasi tiroidea umana condivide larghe omologie immunologiche con la perossidasi equina avendo almeno tre epitopi che sembrano significativamente conservati durante l'evoluzione (7).

Può essere ulteriormente evidenziata la correlazione fra i risultati immunoistochimici e le valutazioni biochimiche. Differenti risultati sono stati ottenuti usando metodi istochimici e biochimici, mentre metodi immunoenzimatici per la valutazione della immunoreattività similperossidasi non sono mai stati confrontati prima con valutazioni biochimiche dell'enzima.

Cambiamenti nella quantità del contenuto della perossidasi sono stati evidenziati nei tumori maligni della tiroide utilizzando metodi differenti (3-5).

Sulla base dei nostri risultati sarà interessante valutare l'immunoreattività della perossidasi in una larga serie retrospettiva di pazienti con patologia neoplastica della tiroide al fine di correlare l'esito con i risultati clinici.

Conclusione

In conclusione il contenuto di perossidasi nella ghiandola potrebbe rivestire un ruolo importante in molte patologie tiroidee e in questo studio noi abbiamo dimostrato che la perossidasi tiroidea può essere evidenziata immunoistochimicamente di routine nel tessuto tiroideo trattato per istologia tradizionale utilizzando un anticorpo disponibile sul mercato

Riassunto

Introduzione: Il contenuto di perossidasi è stato recentemente valutato sia nel tessuto tiroideo normale che in tireopatie di diversa natura per mezzo di metodi biochimici, istochimici, ultrastrutturali ed immunoistochimici. Tuttavia l'evidenziazione immunoistochimica della perossidasi tiroidea nei campioni di tiroide, sottoposti ad istologia tradizionale, non è mai stata effettuata con un anticorpo disponibile in commercio, né è stata effettuata una correlazione con l'attività biochimica dei campioni di tiroide adiacenti.

Materiale e metodi: In questo studio noi abbiamo analizzato tessuto tiroideo normale (3 pazienti), adenoma follicolare (2 pazienti) e gozzo multinodulare (2 pazienti) trattato per istologia tradizionale e colorato immunoistochimicamente (sistema avidinabiotina), utilizzando un anticorpo policlonale di coniglio antiperossidasi equina (Serotec). La valutazione biochimica fu effettuata sui campioni adiacenti in accordo con il metodo di Hosoya.

Risultati: Nel tessuto tiroideo normale l'immunoreattività della perossidasi fu evidenziata nella maggioranza delle cellule follicolari; le cellule tumorali dell'adenoma si colorarono in modo variabile.

La valutazione biochimica ha mostrato una correlazione positiva con il metodo immunoistochimico in un range

che va dal 20,4 µg/mg/prot nel gozzo multinodulare fino a 122 nell'adenoma follicolare.

Conclusioni: Il contenuto di perossidasi nella ghiandola potrebbe rivestire un ruolo importante in molte patologie tiroidee e in questo studio noi abbiamo dimostrato che la perossidasi tiroidea può essere evidenziata immunoistochimicamente di routine nel tessuto tiroideo trattato per istologia tradizionale utilizzando un anticorpo disponibile sul mercato.

Parole chiave: Ghiandola tiroide, perossidasi, immunoistochimica.

Bibliografia

- 1) Degroot L.J., Nieppimnische H.: *Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects*. Metabolism, 26:665-718, 1977.
- 2) Hosoya T., Sato I., Hiyama Y., Yoshimura H., Niimi H., Tarutani O.: *An improved assay method for thyroid peroxidase applicable for a few milligrams of abnormal human thyroid tissue*. J Biochem (Tokio), 98:637-47, 1985.
- 3) Yamasaki Y., Mon K., Naito M., Akagi M.: *Histochemical determination of iodide peroxidase activity in various thyroid disorders*. Am J Surg, 160:271-6, 1990.
- 4) Yamashita H., Noguchi S., Murakami N., Moriuchi A., Nakayama I.: *Ultrastructural localization of endogenous peroxidase activity in benign thyroid diseases*. Acta Pathol Jpn, 37:755-62, 1987.
- 5) De Micco C., Ruf J., Chrestian M.A., Gros N., Henry J.F., Carayon P.: *Immunohistochemical study of thyroid peroxidase in normal, Hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissues*. Cancer, 67:3036-41, 1991.
- 6) Cuello A.C.: *Imunohistochemistry*. In: *Ibro Handbook Series*, vol 3, Chichester New-York, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley and Sons, editor, 1983.
- 7) Ruf J., Toubert M.E., Czarnocka B., Dourand-Gorde J.M., Ferrand M., Carayon P.: *Relationship between immunological structure and biochemical properties of human thyroid peroxidase*. Endocrinol, 125:1211-8, 1989.

Autore corrispondente:

Prof. Francesco CARLEI
Università degli Studi di L'Aquila
Divisione di Chirurgia Geriatrica
Dipartimento Medicina Sperimentale
Via Vetoio
67010 COPPITO - AQ

