

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Estudo da influência do tempo de preparo e temperatura de armazenamento na
imunorreatividade de amostras de câncer de colo uterino**

Cátia Moreira Guterres

Porto Alegre, 2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Estudo da influência do tempo de preparo e temperatura de armazenamento na
imunorreatividade de amostras de câncer de colo uterino**

Cátia Moreira Guterres

Orientador: Prof. Dr. Luciano Serpa Hammes.

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre no Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Guterres, Cátia Moreira

Estudo da influência do tempo de preparo e temperatura de armazenamento na imunorreatividade de amostras de câncer de colo uterino / Cátia Moreira Guterres. -- 2017.

44 f.

Orientador: Luciano Serpa Hammes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. imunohistoquímica. 2. envelhecimento de lâminas. 3. biomarcadores de neoplasia cervical. 4. p16. 5. Ki67. I. Hammes, Luciano Serpa, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, pelo exemplo de dignidade e perseverança e por acreditar na minha capacidade.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, pela oportunidade de realizar o mestrado e pela qualidade do ensino.

Ao meu orientador, Professor Doutor Luciano Serpa Hammes, pelos seus ensinamentos.

Aos meus amigos, que entenderam a minha ausência e acreditaram no meu potencial.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO.....	9
REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	12
2 Marco conceitual.....	13
3 Epidemiologia do câncer de colo uterino	13
4 Biomarcadores	16
5 Imunohistoquímica e biomarcadores de carcinogênese cervical	19
6 Preservação de amostras.....	21
REFERÊNCIAS	24
JUSTIFICATIVA	28
OBJETIVOS	29
Objetivo principal:.....	29
Objetivo secundário:	29
ARTIGO EM INGLÊS	30
PERSPECTIVAS	41
ANEXO	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DAB	Diaminobenzidina
CA-125	Antígeno carboidrato 125
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CSF-1	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	<i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LSIL	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
PSA	<i>Prostate-specific antigen</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marco conceitual da pesquisa	13
--	----

RESUMO

Introdução: O câncer de colo uterino é o quarto câncer mais comum no sexo feminino e um importante problema mundial de saúde pública. Recentemente, o uso de biomarcadores para melhorar a sensibilidade e especificidade do rastreamento e diagnóstico desta patologia passou a ter maior importância. Dentre estes, P16 e Ki67 passaram a ser largamente utilizados em imunohistoquímica de amostras preservadas em parafina. Entretanto, não se sabe qual a influência do tempo e temperatura de armazenamento de amostras previamente cortadas. **Objetivo:** O presente estudo tem por finalidade avaliar a influência do tempo de preparo e temperatura de armazenamento na imunoreatividade para P16 e Ki67 de cortes de amostras cervicais. **Métodos:** Amostras de blocos de parafina de câncer de colo uterino foram seccionadas e montadas em lâminas, de maneira seriada, no período de 9, 6, 3, 1 mês e tempo zero, sendo armazenadas em -20°C, 4°C e temperatura ambiente (TA). Todas as amostras então foram processadas ao mesmo tempo por imunohistoquímica para detecção de P16 e Ki67, sendo realizada leitura da mesma região do tumor nas diferentes condições. **Resultados:** Dos 10 casos de câncer de colo uterino, foram analisadas 75 regiões para P16 e Ki67 nas diferentes condições. A expressão de P16 e Ki67 não variou de maneira significativa ao longo do tempo nas diferentes condições de temperatura de armazenamento. Por exemplo, os cortes de 9 meses apresentaram a seguinte expressão quando armazenados a -20°C, 4°C e TA, respectivamente [mediana (p25-75)]: marcador P16 - 200 (160-300), 200 (180-300) e 200 (170-300), o que não foi estatisticamente diferente do corte em tempo zero, 200 (200-300), $P=0,210$; marcador Ki 67 - 210 (160-270), 210 (160-270) e 210 (145-270), o que também não foi estatisticamente diferente do corte em tempo zero, 240 (180-270), $P=0,651$. **Conclusão:** Não há influência significativa do tempo de preparo e temperatura de armazenamento de lâminas com material já cortado para a realização de imunohistoquímica posteriormente, no período de até 9 meses, para P16 e Ki67. Isto permite que, ao processarmos lâminas para HE e/ou outros marcadores, podemos reservar lâminas para posterior processamento com P16 e Ki67 sem prejuízo à imunoreatividade.

Palavras-chave: imunohistoquímica; envelhecimento de lâminas; biomarcadores de neoplasia cervical; p16; Ki67.

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is the fourth most common cancer in women and a major public health problem in the world. Recently, the use of biomarkers to improve the sensitivity and specificity of the screening and diagnosis of this pathology has become more important. Among these, P16 and Ki67 became widely used in immunohistochemistry of samples preserved in paraffin. However, the influence of storage time and temperature of previously cut samples is not known. **Aim:** The aim of this study was to evaluate the influence of preparation time and storage temperature on the immunoreactivity for P16 and Ki67 of cervical specimens. **Methods:** Cervical cancer paraffin blocks were sectioned and mounted onto glass slides in 9, 6, 3, 1 month and zero time and stored at -20°C, 4°C and room temperature (RT). All slides were then processed at the same time by immunohistochemistry for the detection of P16 and Ki67, and the same tumor region was read under the different conditions. **Results:** Of the 10 cases of cervical cancer, 75 regions were analyzed for P16 and Ki67 under different conditions. Expression of P16 and Ki67 did not vary significantly over time at different storage temperature conditions. For example, the 9-month slides showed the following expression when stored at -20°C, 4°C and RT, respectively [median (p25-75)]: P16 - 200 (160-300), 200 (180-300) and 200 (170-300), which was not statistically different from zero time cut, 200 (200-300), $P = 0.210$; Ki 67 - 270 (160-270), 210 (160-270) and 210 (145-270), which was also not statistically different from zero-time cutoff, 240 (180-270), $P = 0.651$. **Conclusion:** There is no significant influence of the preparation time and storage temperature of slides of cervical cancer to be processed by immunohistochemistry later, in the period of up to 9 months, for P16 and Ki67. This allows, when processing slides for HE and / or other markers, we can reserve slides for further processing with P16 and Ki67 without impairing immunoreactivity.

Keywords: immunohistochemistry; aging of blades; biomarkers of cervical neoplasia; P16; Ki67.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer de colo uterino é o segundo tipo de câncer mais frequente entre mulheres, representando a segunda principal causa de morte por neoplasias entre mulheres em geral e a primeira causa naquelas com idade entre 15 a 44 anos.¹

Na estratégia de combate ao câncer de colo uterino, um dos fatores mais relevantes foi reconhecer que o desenvolvimento da oncogênese cervical está associado à infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV).^{2,3} Na maioria dos casos, o HPV causa uma infecção transitória, não apresenta sintomas e desaparece espontaneamente.⁴

Apesar da vacinação contra o HPV ser exitosa, sabemos que casos de câncer de colo uterino potencialmente continuarão a ocorrer, pois nem todos os subtipos são combatidos pela vacina e sua cobertura populacional é um desafio. Assim, o rastreamento do câncer de colo uterino visa detectar alterações pré-malignas, que, se não tratadas, podem evoluir ao câncer, porém, o rastreio só é eficaz se houver um sistema bem organizado de acompanhamento e tratamento.²

O rastreamento passa por diferentes etapas, baseando-se na maioria das vezes na citopatologia, colposcopia e biópsia.

Durante os últimos 50 anos, houve uma redução da mortalidade por carcinoma cervical em locais onde implementou-se um programa adequado de rastreamento através do exame citopatológico de colo uterino.⁵

O câncer de colo uterino, tido como invasor, evolui a partir da neoplasia intraepitelial cervical I (NIC I), porém nem toda NIC evoluirá para uma doença invasora, no entanto, ressalta-se que todas as NIC devem ser consideradas como lesões significativas e, como tal, devem ser acompanhadas.⁶

As lesões precursoras do Carcinoma Escamoso da Cérvix Uterina são divididas em:

- a) Neoplasia Intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I / displasia leve).

b) Neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC II / NIC III, displasia moderada, displasia severa, carcinoma *in situ*).⁷

Entretanto, devemos reforçar que o câncer de colo uterino provavelmente continuará sendo uma realidade em nosso meio, porque a vacinação possivelmente não estará disponível para todas as mulheres e também vários subtipos oncogênicos ainda não estão cobertos pela vacinação.^{8,9}

Para apoiar o rastreamento/diagnóstico cito/histológico, inúmeros marcadores tumorais têm sido utilizados, os quais teoricamente existem somente na presença do tumor e estão ausentes em indivíduos saudáveis.¹⁰

Os biomarcadores podem ser utilizados para adicionar sensibilidade e especificidade ao rastreamento do câncer de colo uterino. O rastreamento por citologia cervical, baseado no exame de Papanicolau, comprovadamente reduziu mortalidade.¹¹ Entretanto, é trabalhoso, requer um grupo qualificado de citotécnicos e patologistas, e depende da observação humana. O uso de um marcador específico de lesões seria extremamente útil para acrescentar objetividade à citologia cervical.¹²

Dentre os biomarcadores do processo de carcinogênese cervical, inúmeras proteínas estão sendo estudadas atualmente como a p53, pRb, p16 e Ki67, sendo estas duas últimas já utilizadas na prática

Em vista de que os eventos moleculares que levam ao fenótipo maligno celular são mediados por proteínas, a estratégia para desvendar o processo de oncogênese cervical pode estar baseado em estudos relacionados a presença e a função destas proteínas.¹⁰ A Imunohistoquímica (IHC) tornou-se amplamente utilizada em patologia diagnóstica e também investigativa desde a década de 70, quando então, a produção de anticorpos monoclonais foi possível em quantidades comerciais. A grande vantagem do emprego da imunohistoquímica no estudo da carcinogênese cervical decorre do fato de que as lesões cervicais intraepiteliais são, na maioria das vezes, restritas a pequenas regiões do tecido, necessitando visão direta da morfologia celular.¹⁰

Sabe-se que amostras de tecidos já cortadas podem potencialmente perder sua capacidade antigênica quando preservadas em temperatura ambiente, provocando resultados falso-negativos. Entretanto, esta perda não é igual para todos os tipos de tecidos e anticorpos testados.^{13,14} Estudos em *microarrays* de tecido mamário demonstram também que mesmo a preservação das amostras em refrigeração não é suficiente manter a expressão de receptores de estrógeno, progesterona, ciclina D1 e HER2.¹⁵

Apesar do aumento considerável nos últimos anos de estudos que utilizam detecção de antígenos cervicais por imunohistoquímica, não existem muitas referências relacionadas ao envelhecimento de amostras cervicais e perda de antigenicidade.

REVISÃO DA LITERATURA

1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A busca de artigos para a revisão da literatura foi realizada no PUBMED, SciELO e LILACS com as seguintes palavras-chave: 1) *Uterine Cervical Neoplasms*; 2) *human papillomavirus*; 3) *Immunohistochemistry*; 4) *Biomarkers, Tumor*; 5) *Immunostaining*; 6) *Staining*; 7) *Storage slides*.

Optou-se pela busca no PUBMED, tendo em vista que o número de artigos encontrados foi maior do que nos outros bancos de referências.

Em relação ao termo *human papillomavirus* foram encontrados 41773 artigos.

Em relação ao termo *Uterine Cervical Neoplasms/diagnosis* foram encontrados 70017 artigos.

Combinando-se as palavras-chave *Storage slides OR Staining AND Immunostaining OR Biomarkers, Tumor OR Immunohistochemistry AND human papillomavirus OR Uterine Cervical Neoplasms* obteve-se 2254 artigos.

Buscando outras combinações mais específicas, não se obteve resultados satisfatórios.

Foram incluídas também webpages do Instituto Nacional do Câncer. Organização Mundial da Saúde e Ministério da Saúde.

Palavras-chave

- 1) *Uterine Cervical Neoplasms*
- 2) *human papillomavirus*
- 3) *Immunohistochemistry*
- 4) *Biomarkers, Tumor*
- 5) *Immunostainings*
- 6) *Staining*
- 7) *Storage slides*

SciELO

1 = 357
2 = 728
3 = 1846
4 = 89
5 = 236
6 = 2172
7 = 10
1+2+3+4+5+6+7 = 6

PUBMED

1 = 70017
2 = 41773
3 = 650066
4 = 247194
5 = 45864
6 = 408635
7 = 352
1+2+3+4+5+6+7 = 2254

LILACS

1 + 3 + 6 = 5

2 Marco conceitual

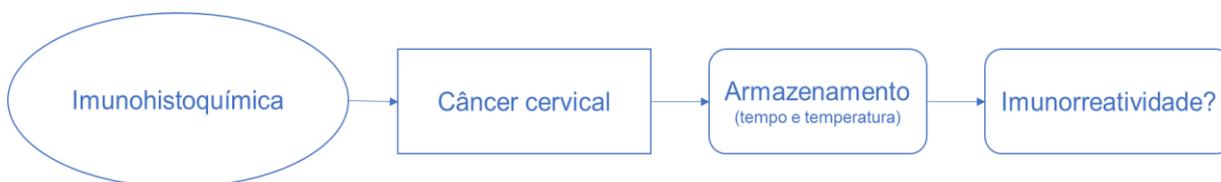


Figura 1. Marco conceitual esquemático da pesquisa

A proteção das amostras seccionadas com imersão em parafina pode ser pouco eficaz na preservação de antígenos. Este problema é ainda maior quando consideramos estudos colaborativos, onde materiais são preparados em diferentes épocas e submetidos à variação de temperatura durante o transporte para o centro que realizará a análise final.¹⁶

As amostras cervicais utilizadas neste estudo foram marcadas com os anticorpos p16 e Ki67, cortadas, armazenadas e analisadas em períodos e em temperaturas diferentes.

Será que essas amostras sofreram influência quanto à imunorreatividade?

3 Epidemiologia do câncer de colo uterino

O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia que mais afeta mulheres no mundo e a segunda causa de morte por câncer em mulheres. As estimativas brasileiras para os anos de 2016 - 2017 indicaram a ocorrência de 600.000 novos casos de câncer, dentre eles o câncer de colo uterino encontra-se entre os mais frequentes, juntamente com o câncer de mama e intestino.¹

Importantes variações regionais na incidência do câncer de colo uterino são observadas, sendo que os estados com menor nível de desenvolvimento socioeconômico registram as maiores taxas.¹⁷ A maior incidência registrada está na região norte com 24 casos para 100.000 mulheres/ano. Nas regiões centro-oeste,

nordeste, sul e sudeste, a incidência é de 21, 19, 15 e 11 para 100.000 mulheres/ano, respectivamente.¹

No Brasil, o controle do câncer de colo uterino iniciou a partir das iniciativas pioneiras de profissionais que trouxeram para nosso meio a citologia e a colposcopia, a partir de 1940. Entre 1972 e 1975, o Ministério da Saúde, desenvolveu e implementou o Programa Nacional de Controle do Câncer, que se destinava a enfrentar o câncer em geral, mas que deu destaque ao rastreamento do câncer de colo uterino, sendo a primeira ação de âmbito nacional do Ministério da Saúde para a prevenção do câncer de colo uterino.¹⁸

Em 2011, foram publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) as Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero com a revisão e atualização das recomendações de conduta clínica existentes na Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais de Condutas Preconizadas.¹⁸

Estratégias do Sistema Único de Saúde (SUS) têm se mostrado eficazes no diagnóstico precoce e na redução da mortalidade por câncer de colo uterino em nosso país.

O câncer de colo uterino é uma doença que se caracteriza por evolução lenta de estágios pré-malignos (neoplasia intraepitelial cervical, NIC) até a forma invasora. A incidência de NIC é extremamente maior que a do próprio câncer, mas não existem estimativas oficiais da prevalência destas lesões. O Estudo LAMS – Latim American Screening Study, desenvolvido em Porto Alegre, Campinas, São Paulo e Buenos Aires, com cerca de 12.000 mulheres rastreadas para câncer de colo uterino, a prevalência de lesões cervicais de baixo grau (low-grade squamous intraepitelial lesion, LSIL) variou de 1.300 a 1.860 casos / 100.000 mulheres, enquanto lesões de alto grau (high-grade squamous intraepitelial lesion, HSIL) apresentaram prevalência de 990 a 1.180 casos / 100.000 mulheres.¹⁹ Estudos semelhantes de rastreamento populacional têm demonstrado resultados semelhantes ou com prevalência ainda maior de lesões pré-malignas.^{20,21}

No início da década de 70, a associação com papilomavírus humano (HPV) mudou o rumo do controle do câncer cervical. Zur Hausen, Meislen e Fortin

publicaram uma série de artigos em que descreveram a relação de HPV, coilócitos e displasia leve em citologia cervical, indicando o fator etiológico para o desenvolvimento de lesões cervicais. Entretanto, os primeiros subtipos de HPV associados à oncogênese foram isolados de amostras cervicais somente depois de uma década desta descoberta.²²

A história do câncer de colo uterino teve seu grande marco, quando foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) a primeira vacina para prevenção desta doença em 8 de junho de 2006.²³

A vacinação do HPV foi adotada como política de saúde pública em dezenas de países, tendo se mostrado eficaz na redução do número de casos da doença.²⁴ A discussão sobre a incorporação da vacina tem sido pautada no Ministério da Saúde desde o registro da primeira vacina pela ANVISA em 2006,²⁵ mas somente em março de 2014 que foi iniciado o programa nacional de vacinação contra o HPV no Brasil. A vacinação confere proteção contra os subtipos 6, 11, 16 e 18 (vacina quadrivalente) do HPV.²⁴

O HPV é um vírus da família *Papillomaviridae* possuindo mais de 100 subtipos com diferentes potenciais patogênicos e sítios de infecção. A maioria deles é considerada de baixo risco para neoplasias de trato genital e não genital, apresentando-se como verrugas genitais e cutâneas. Os subtipos de HPV associados ao desenvolvimento de lesões malignas de colo de útero são, principalmente os subtipos: 6, 11, 16, 18, 31 e 33.²⁶ No Brasil, estima-se que em torno de 80% dos casos de câncer de colo uterino sejam causados pelos subtipos virais 16 e 18, sendo a prevalência nacional estimada dos mesmos de, respectivamente 53% e 16%, semelhante à média global (53% e 13%, respectivamente).^{27,28} Apesar da alta incidência, o câncer de colo uterino é uma doença passível de rastreamento e cura, quando diagnosticada em estágios precoces.

Apesar de termos desvendado a associação do HPV e câncer de colo uterino, inúmeras outras questões ainda devem ser respondidas no processo de carcinogênese cervical. Sabe-se que o HPV infecta as células e muda o seu fenótipo, mas o mecanismo que faz algumas células progredirem para câncer ainda

é bastante obscuro. Como todas as células tumorais de outros tecidos, as células epiteliais cervicais imortalizadas requerem eventos básicos para sua sobrevivência, independência de sinais externos para crescimento, insensibilidade a sinais externos de supressão, resistência a apoptose, potencial de replicação ilimitado, capacidade de promover angiogênese e intensa invasividade. O conhecimento atual é baseado nos eventos iniciais que a infecção pelo HPV causa, porém, centenas de vias bioquímicas ainda necessitam ser desvendadas.²⁹

4 Biomarcadores

Durante as últimas décadas, tem-se investido em técnicas para a detecção precoce do câncer, na identificação de fatores de risco de progressão / recidiva e no descobrimento de alvos terapêuticos do processo de oncogênese.¹⁰

O primeiro teste reconhecido com biomarcador para tumor foi em 1965, quando Joseph Gold identificou o antígeno cárcino-embriônico no sangue de pacientes com câncer de cólon, encontrado até então somente em tecidos fetais.³⁰ Posteriormente, inúmeros outros biomarcadores, como antígeno carboidrato 125 (CA-125) para câncer de ovário, passaram a ser empregados na rotina de investigação clínica.³¹

O biomarcador mais amplamente utilizado na última década é o antígeno prostático específico sérico (prostate-specific antigen, PSA), empregado para rastreamento de câncer de próstata. Sua utilização trouxe um aumento expressivo no número de diagnósticos precoces e, por conseguinte, melhor prognóstico da doença.³⁰

Apesar da literatura demonstrar sucesso e relevância de alguns biomarcadores em neoplasias de tecido específicos, como demonstrado acima, em câncer de colo uterino não dispomos até o momento de marcador efetivo com os seguintes propósitos:

- 1) melhorar a especificidade do rastreamento do câncer de colo uterino;
- 2) reconhecer o risco de progressão de determinadas lesões;

3) compreender os processos que se seguem à infecção pelo HPV, para assim desenvolvermos tratamentos mais efetivos.^{10,12,29}

Provavelmente a grande utilidade de marcadores tumorais em carcinogênese cervical seja em prognóstico de lesões pré-malignas. Certamente a maioria das NIC de baixo grau não progredirá para lesões mais graves, contudo, não há como determinar quais lesões progredirão. Como resultado desta falta de fator prognóstico, há uma preocupação em tratar de lesões que nunca irão progredir para forma invasora, gerando custos e desconforto às pacientes.³² A detecção de NIC de baixo grau associada à fatores de risco objetivos (biomarcadores) poderia possibilitar ao ginecologista um tratamento efetivo imediato, ou, na ausência destes, apenas o acompanhamento rotineiro das pacientes.³³

Baak e cols. (2005), referem-se ao impacto que o descobrimento de um biomarcador efetivo proporcionaria ao avaliar o risco de progressão de NIC. A adição do uso de identificação de Ki67 e pRb no manejo de pacientes com lesões até NIC II ocasionaria uma diminuição de cerca de 20.000 tratamentos desnecessários por ano na União Europeia. É importante lembrar que as taxas de prevalência de lesões intraepiteliais cervicais na União Europeia (172/100.000 mulheres) são infinitamente menores que as da população brasileira, o que indica que o uso de biomarcadores seria ainda mais útil em nossa realidade.

O entendimento das vias bioquímicas da carcinogênese pode sugerir o desenvolvimento de drogas terapêuticas que ao agir em determinada etapa do processo de malignização podem proporcionar o bloqueio da rota bioquímica. Como exemplo, tem sido descrito um aumento da expressão de COX-2 na medida em que as lesões cervicais invasoras acentuam-se, sugerindo que esta enzima possa ser alvo para tratamentos oncológicos. Ainda mais, a experiência obtida em outros tumores, como o câncer de cólon, mostra que o uso de inibidores da COX-2 diminui a progressão da doença. Estudos iniciais demonstraram que a inibição da COX-2 em câncer de colo uterino está associada a uma melhor resposta ao tratamento radioterápico, aumento do índice de apoptose e regressão da neovascularização associada.^{34,35}

Dentre os possíveis biomarcadores do processo de carcinogênese cervical, inúmeras proteínas estão sendo estudadas atualmente como p53, pRb, geminina,

p16 e Ki67. Aliás, muitos já utilizados na rotina de laboratório de patologia como P16 e Ki67.

Sabe-se que fatores de crescimento estão potencialmente envolvidos na carcinogênese cervical, como, por exemplo: fator transformador de crescimento beta (transforming growth factor beta, TGF- β) que atua como um fator antiproliferativo em estágios iniciais da oncogênese; fator estimulador de colônia de macrófagos (macrophage colony stimulating factor, CSF-1) que estimula a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas; enzima aromatase que é responsável pela conversão testosterona – estradiol. Entretanto, estes necessitam de uma melhor investigação como biomarcadores em patologia cervical.

Fatores de crescimento são interessantes alvos de estudo, pois além de agirem diretamente na proliferação celular, influenciam outros mecanismos que suportam a oncogênese como angiogênese, sinalização e inflamação.

Estudos sobre a expressão de TGF- β 1 e seus receptores no câncer cervical apresentam dados conflitantes. Análises por IHC de diferentes estágios de NIC e carcinoma escamoso invasor (squamous cell carcinoma, SCC) mostram que TGF- β 1 diminui à medida que a lesão progride, sugerindo uma perda de controle celular.^{36,37} Entretanto, outros estudos demonstram que existe um aumento da expressão de TGF- β 1 com a progressão das lesões.^{38,39}

Quando se verificou a questão do fator estimulador de colônia de macrófagos em relação à carcinogênese cervical, identificou-se que pacientes com NIC ou simplesmente com infecção pelo HPV apresentam maiores níveis séricos de CSF-1 quando comparadas a pacientes saudáveis.⁴⁰ CSF-1 também está mais elevado em pacientes com tumores cervicais avançados do que em pacientes com tumores iniciais.⁴¹ Adicionalmente, foi demonstrado que células epiteliais de três diferentes linhagens (endocervical, ectocervical e vaginal) quando imortalizadas com genes E6 e E7 de HPV 16 secretam altos níveis de CSF-1 *in vitro*, o que também foi evidenciado *in vivo* em secreções vaginais.⁴²

A enzima aromatase e a sua relação com oncogênese têm sido descrita em tecido mamário onde ocasiona aumento da atividade estrogênica e consequentes lesões pré-malignas / malignas por desregulação de receptores hormonais, de

fatores de crescimento e de fatores de controle do ciclo celular. Na carcinogênese cervical é extremamente limitada, sendo descrita pela primeira vez, em 2005.⁴³

5 Imunohistoquímica e biomarcadores de carcinogênese cervical

Eventos moleculares que levam ao fenótipo maligno celular são mediados por proteínas e a estratégia para desvendar o processo de oncogênese baseia-se em estudar a presença e função destas proteínas. A IHC tornou-se amplamente utilizado em patologia diagnóstica e também investigativa desde a década de 70, quando, então, a produção de anticorpos monoclonais foi possível em quantidades comerciais. A grande vantagem do emprego da IHC no estudo da carcinogênese cervical decorre do fato de que as lesões cervicais intraepiteliais são, na maioria das vezes, restritas a pequenas regiões do tecido, necessitando visão direta da morfologia celular.¹⁰

A IHC tem se mostrado indispensável para o diagnóstico diferencial de vários tumores que são rotineiramente fixados em parafina, também utilizada em amostras não processadas, amostras congeladas, raspados citológicos e cultura celular. Inicialmente, a IHC era aplicada para identificar a presença de estruturas virais em amostras de biópsias cervicais, mas atualmente o papel da IHC é na compreensão das etapas da carcinogênese cervical, em busca de potenciais biomarcadores.¹⁰

É importante que se faça uma comparação entre as técnicas de investigação para detecção de DNA, RNA e proteínas. Enquanto a detecção de DNA por diferentes técnicas de hibridização ou PCR indica que existe, por exemplo, a presença do HPV no tecido, não se pode inferir atividade viral. Já a detecção de transcriptase viral por PCR indica que a transcrição do vírus está ocorrendo. Por fim, como resultado da atividade viral e integração ao genoma celular, temos produção / expressão de proteínas, alvo do estudo de biomarcadores, que serão identificadas por IHC.¹⁰

Entretanto, o uso de IHC apresenta uma série de limitações técnicas, principalmente na reprodutibilidade e interpretação dos procedimentos. Em relação à reprodutibilidade, a preservação do material analisado é um fator importante a ser

considerado, principalmente depois de realizado o corte dos blocos de parafina. Rotineiramente em laboratórios de pesquisa, quando uma grande quantidade de material precisa ser analisado, inúmeras amostras já cortadas e distendidas em lâminas são arquivadas por meses até que se faça a análise final.⁴⁴

As proteínas p16 e Ki67 são utilizadas em combinação na imunocitoquímica para diagnóstico de câncer de colo uterino desde 2010, com o objetivo de proporcionar um método mais seguro para o diagnóstico e gerenciamento das pacientes.⁴⁵

A proteína p16 inibe a proliferação celular pela ativação de pRb, bloqueando a atividade de promotores do ciclo celular como ciclinas A e E. Em câncer de colo uterino, evidências sugerem que a infecção pelo HPV ocasione inativação de p16 que, apesar de expressado intensamente, não tem atividade de bloqueio do ciclo celular.⁴⁶ Em lesões cervicais, a expressão de p16 é positiva na maioria das HSIL, mas também em alguns casos de LSIL, frequentemente aqueles associados com HPV de alto risco. Este marcador tem sido utilizado clinicamente para identificar lesões intraepiteliais pequenas e focais, e ainda para distinguir casos de metaplasia imatura de NIC.⁴⁶

Ki67 é um marcador de proliferação celular detectado em todas as fases do ciclo celular pelo anticorpo MIB-1. Em cérvix normal, a expressão de Ki67 é restrita às camadas basais e parabasais do epitélio cervical. Entretanto, no desenvolvimento de NIC, a expressão de Ki67 pode ser identificada nas camadas intermediárias e superficiais do epitélio, correlacionando-se com a gravidade das lesões. Assim como p16, Ki67 tem sido utilizado como método auxiliar na graduação histopatológica de lesões cervicais.^{31,33}

Existem algumas limitações na indicação da combinação p16 / ki67 devido a especificidade em pacientes jovens com displasia moderada. Ziemke (2017), aponta que a especificidade em pacientes jovens (< 30 anos) é menor do que em pacientes com mais de 30 anos de idade, resultando em desfechos falso-positivos. Uma explicação pouco consistente, seria o fato que as mulheres com maior idade fossem expostas ao agente infeccioso por um período mais longo de tempo. No entanto, esses achados não se confirmam para displasia de alto risco e a combinação

desses marcadores não permitem uma conclusão definitiva sobre o risco aumentado para lesões de alto grau.⁴⁵

6 Preservação de amostras

Os locais de armazenamento para amostras biológicas, chamados de biobancos, são extremamente importantes para pesquisas clínicas que estudam a eficiência de diferentes terapias contra o câncer. Estes tecidos recuperados dos ensaios clínicos são geralmente limitados a um pequeno número de secções não preservadas adequadamente, analisadas por patologistas locais e posteriormente armazenadas em um biobanco.⁴⁷

A prática de colecionar lâminas histológicas cortadas de blocos de parafina e não coradas é dificultada quando evidências sugerem que os armazenamentos de longa data podem perder significativamente os resultados das análises moleculares, incluindo as técnicas moleculares de hibridação *in situ*, fluorescência e imunohistoquímica.¹⁵

Sabe-se que o armazenamento de materiais por períodos maiores tempos de podem afetar consideravelmente a qualidade da coloração imunohistoquímica, resultando em resultados negativos,⁴⁸ e quanto maior o tempo de armazenamento em temperatura ambiente, piores são os efeitos sobre a antigenicidade.¹³

Além disso, o armazenamento de materiais de câncer de mama, linfoma e tumores neuroendócrinos para posterior processamento para detecção de Ki67 e outros biomarcadores durante 3 meses em temperatura ambiente, apresentou perda no percentual de células positivas e na intensidade da coloração comparadas àquelas lâminas que não foram armazenadas.^{48,49}

Estudos em *microarrays* de tecidos mamários demonstram também que mesmo a preservação das amostras em refrigeração não é suficiente para manter a expressão de receptores de estrógeno, progesterona, ciclina D1 e HER2.⁴⁷ Adicionalmente, a proteção das amostras seccionadas com imersão em parafina tem se mostrado pouco eficaz na preservação de antígenos.¹⁵

A perda de imunorreatividade é dependente do tempo, relacionado a variedade de diagnósticos, prognósticos, e anticorpos usados em lâminas não preservadas, preparadas com tecido fixado na formalina em blocos de parafina.⁵⁰

Fatores de armazenamento incluindo temperatura, luminosidade e ar ambiente podem causar perda de integridade do epítipo. Um estudo realizado sobre a estabilidade do epítipo examinou 20 anticorpos monoclonais e 12 policlonais em lâminas precortadas de carcinoma ductal e armazenadas a temperaturas de 4°C, 21°C e 37°C em períodos de tempo que variaram entre 2 e 52 semanas. No geral, 34% dos seus achados imunohistoquímicos foram alterados com armazenamento a 21°C em comparação com 12% afetados com temperatura de 4°C.¹⁵

Andeen, et al. (2017), demonstraram que em aproximadamente 1 ano, o grau de preservação do biomarcador Ki67 em comparação com o tempo 0 variou com as diferentes técnicas utilizadas. O resultado foi apresentado através de H-score, calculando a pontuação de intensidade multiplicada pela porcentagem de células positivas. Quando comparada preservação de blocos de parafina em temperatura ambiente à preservação à vácuo em -20°C, temos 37% vs 92%, respectivamente. Em lâminas expostas ao ar, nas semanas 52 a 55, a mediana de score-H caiu para 62% para aqueles armazenados em temperatura ambiente, 68% para as lâminas armazenadas na geladeira e 78% para os armazenados a - 20°C em comparação com o tempo 0, não havendo resultados significativos para nenhum deles. Para aquelas com armazenamento à vácuo em 1 ano, a detecção de epítipos foi de 65% do original para lâminas armazenadas em temperatura ambiente, 92% para aquelas a - 20°C e 86% a - 80°C. O revestimento de parafina mostrou perda significativa de coloração nas semanas 52 a 55 (37% do original; p = 0,0091).⁵¹

Grillo e cols. (2015) traçaram um estudo com objetivo de avaliar todos os fatores possíveis que poderiam levar à decomposição do antígeno em uma coleta prospectiva padronizada de tecidos humanos com 14 anticorpos usados em rotinas laboratoriais, comparando a imunorreatividade em tempo 0. A redução da imunocoloração foi observada para os seguintes anticorpos: CD3, CD 31, CD117, receptores de estrogênio e progesterona, Ki67, p53, TTF-1, vimentina. Para os demais anticorpos: actina do músculo liso, queratinas 7, 20, AE1 / AE3, 34βE12, não se observou deterioração do antígeno. Então, concluiu-se que a perda de

antigenicidade era proporcional à idade da secção de tecido e dependia do modo de armazenamento.⁵²

Nuovo e cols. (2013) mostraram que a comparação entre os sinais baseados em *in situ* e imunohistoquímica para amostras de neoplasia intraepitelial cervical no período de tempo de 0 a 15 anos mostrou diminuição progressiva e estatisticamente significativa na força do sinal do biomarcador p16.⁵³

Apesar de alguns desafios na padronização destas observações, vários estudos fornecem evidências de que é necessária uma investigação clínica mais minuciosa baseada nas técnicas da imunohistoquímica, considerando as condições de armazenamento para as lâminas previamente cortadas.⁵⁴

REFERÊNCIAS

1. INCA,2016. Estimativa,2016 [Internet]. [citado 19 de outubro de 2017]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Screening for cervical cancer [Internet]. [citado 21 de outubro de 2017]. Disponível em: http://www.who.int/cancer/detection/cervical_cancer_screening/en/
3. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* abril de 2002;55(4):244–65.
4. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine.* 30 de março de 2006;24 Suppl 1:S1-15.
5. Harlan LC, Bernstein AB, Kessler LG. Cervical cancer screening: who is not screened and why? *Am J Public Health.* julho de 1991;81(7):885–90.
6. Coordena- BM da SS de A à SIN de C, ção de Prevenção e Vigilância., INCA. NOMENCLATURA BRASILEIRA PARA LAUDOS CERVICAIS E CONDUTAS PRECONIZADAS [Internet]. Rio de Janeiro; 2006. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/Titulos/Nomenclatura_colo_do_uterio.pdf
7. Ilce Ferreira da Silva PR do P. Caracterização do Perfil das Mulheres com Resultado Citológico ASCUS/AGC, LSIL e HSIL segundo Fatores Sociodemográficos, Epidemiológicos e Reprodutivos em Rio Branco - AC, Brasil [Internet]. 2012. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/rbc/n_58/v03/pdf/17_artigo_caracterizacao_perfil_mulheres_resultado_citologico_ascus_agc_lsil_hsil_segundo_fatores_sociodemograficos_epidemiologicos_reprodutivos_rio_branco_ac_brasil.pdf
8. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine.* 18 de março de 2005;23(17–18):2388–94.
9. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest.* maio de 2006;116(5):1167–73.
10. Syrjänen KJ. Immunohistochemistry in assessment of molecular pathogenesis of cervical carcinogenesis. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005;26(1):5–19.
11. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol.* 1º de abril de 1995;141(7):680–9.
12. Unger ER, Steinau M, Rajeevan MS, Swan D, Lee DR, Vernon SD. Molecular Markers for Early Detection of Cervical Neoplasia. *Dis Markers.* 2004;20(2):103–16.
13. DiVito KA, Charette LA, Rimm DL, Camp RL. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* agosto de 2004;84(8):1071–8.
14. Shin HJ, Kalapurakal SK, Lee JJ, Ro JY, Hong WK, Lee JS. Comparison of p53 immunoreactivity in fresh-cut versus stored slides with and without microwave heating. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* março de 1997;10(3):224–30.

15. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 7 de agosto de 1996;88(15):1054–9.
16. Olapade-Olaopa EO, Ogunbiyi JO, MacKay EH, Muronda CA, Alonge TO, Danso AP, et al. Further characterization of storage-related alterations in immunoreactivity of archival tissue sections and its implications for collaborative multicenter immunohistochemical studies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* setembro de 2001;9(3):261–6.
17. Zimmerman RK, Nowalk MP, Lin CJ, Fox DE, Ko F-S, Wettick E, et al. Randomized Trial of an Alternate Human Papillomavirus Vaccine Administration Schedule in College-Aged Women. *J Womens Health.* agosto de 2010;19(8):1441–7.
18. Instituto Nacional de Câncer (Brazil). Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. 2011.
19. Sarian LO, Derchain SF, Naud P, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, Tatti S, et al. Evaluation of visual inspection with acetic acid (VIA), Lugol's iodine (VILI), cervical cytology and HPV testing as cervical screening tools in Latin America. This report refers to partial results from the LAMS (Latin American Screening) study. *J Med Screen.* 2005;12(3):142–9.
20. Sankaranarayanan R, Basu P, Wesley RS, Mahe C, Keita N, Mbalawa CCG, et al. Accuracy of visual screening for cervical neoplasia: Results from an IARC multicentre study in India and Africa. *Int J Cancer.* 20 de julho de 2004;110(6):907–13.
21. Franco EL, Schlecht NF, Saslow D. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J Sudbury Mass.* outubro de 2003;9(5):348–59.
22. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* maio de 2002;2(5):342–50.
23. Food and Drug Administration (FDA). FDA Licenses: New Vaccine for Prevention of Cervical Cancer and Other Diseases in Females Caused by Human Papillomavirus [Internet]. 2006. Disponível em: http://www.natap.org/2006/newsUpdates/060906_01.htm
24. Ministério da Saúde 2013. Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC -82. 2013.
25. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS no 3.124, de 7 de dezembro de 2006. [Internet]. 3.124 dez 7, 2006. Disponível em: ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2006/iels.dezembro.06/iels236/U_PT-MS-GM-3124_071206.pdf
26. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *J Infect Dis.* 15 de dezembro de 2010;202(12):1789–99.
27. Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? the international perspective: HPV Types for Vaccines and Screening Tests. *Int J Cancer.* 20 de agosto de 2004;111(2):278–85.

28. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 1º de agosto de 2007;121(3):621–32.
29. Jan P.A. Baak Bianca van Diermen, Arnold-Jan Kruse, Emiel Janssen. Predictive testing of early CIN behaviour by molecular biomarkers. *Cellular Oncology* 27.
30. Chatterjee SK, Zetter BR. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol Lond Engl*. fevereiro de 2005;1(1):37–50.
31. Bast RC, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, et al. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc*. dezembro de 2005;15 Suppl 3:274–81.
32. Padilla-Paz LA. Emerging technology in cervical cancer screening: status of molecular markers. *Clin Obstet Gynecol*. março de 2005;48(1):218–25.
33. Kruse A-J, Baak JPA, Janssen EA, Kjellevoid K-H, Fiane B, Lovslett K, et al. Ki67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cell Oncol Off J Int Soc Cell Oncol*. 2004;26(1–2):13–20.
34. Milas L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Enzyme Inhibitors and Radiotherapy: Preclinical Basis. *Am J Clin Oncol*. agosto de 2003;26(Supplement 2):S66–9.
35. Kim S-H, Song S-H, Kim S-G, Chun K-S, Lim S-Y, Na H-K, et al. Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target. *J Cancer Res Clin Oncol*. setembro de 2004;130(9):551–60.
36. El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. Decreased synthesis and expression of TGF-beta1, beta2, and beta3 in epithelium of HPV 16-positive cervical precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry. *J Pathol*. dezembro de 2000;192(4):494–501.
37. Torng P-L, Chan W-Y, Lin C-T, Huang S-C. Decreased expression of human papillomavirus E2 protein and transforming growth factor-beta1 in human cervical neoplasia as an early marker in carcinogenesis. *J Surg Oncol*. setembro de 2003;84(1):17–23.
38. Hazelbag S, Gorter A, Kenter GG, van den Broek L, Fleuren G. Transforming growth factor-beta1 induces tumor stroma and reduces tumor infiltrate in cervical cancer. *Hum Pathol*. dezembro de 2002;33(12):1193–9.
39. Xu Q, Wang S, Xi L, Wu S, Chen G, Zhao Y, et al. Effects of human papillomavirus type 16 E7 protein on the growth of cervical carcinoma cells and immuno-escape through the TGF-beta1 signaling pathway. *Gynecol Oncol*. abril de 2006;101(1):132–9.
40. Adam RA, Horowitz IR, Tekmal RR. Serum levels of macrophage colony-stimulating factor-1 in cervical human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol*. janeiro de 1999;180(1 Pt 1):28–32.
41. Suzuki M, Ohwada M, Sato I, Nagatomo M. Serum level of macrophage colony-stimulating factor as a marker for gynecologic malignancies. *Oncology*. abril de 1995;52(2):128–33.

42. Fichorova RN, Anderson DJ. Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Biol Reprod.* fevereiro de 1999;60(2):508–14.
43. Nair HB, Luthra R, Kirma N, Liu Y-G, Flowers L, Evans D, et al. Induction of aromatase expression in cervical carcinomas: effects of endogenous estrogen on cervical cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 1º de dezembro de 2005;65(23):11164–73.
44. van den Broek LJ, van de Vijver MJ. Assessment of problems in diagnostic and research immunohistochemistry associated with epitope instability in stored paraffin sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* dezembro de 2000;8(4):316–21.
45. Ziemke P. p16/Ki-67 Immunocytochemistry in Gynecological Cytology: Limitations in Practice. *Acta Cytol.* 2017;61(3):230–6.
46. O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol.* janeiro de 2006;13(1):8–15.
47. Mirlacher M, Kasper M, Storz M, Knecht Y, Dürmüller U, Simon R, et al. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* novembro de 2004;17(11):1414–20.
48. Bertheau P, Cazals-Hatem D, Meignin V, de Roquancourt A, Vérola O, Lesourd A, et al. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol.* maio de 1998;51(5):370–4.
49. Wester K, Wahlund E, Sundström C, Ranefall P, Bengtsson E, Russell PJ, et al. Paraffin section storage and immunohistochemistry. Effects of time, temperature, fixation, and retrieval protocol with emphasis on p53 protein and MIB1 antigen. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* março de 2000;8(1):61–70.
50. Prioleau J, Schnitt SJ. p53 Antigen Loss in Stored Paraffin Slides. *N Engl J Med.* junho de 1995;332(22):1521–2.
51. Andeen NK, Bowman R, Baullinger T, Brooks JM, Tretiakova MS. Epitope Preservation Methods for Tissue Microarrays. *Am J Clin Pathol.* 2 de novembro de 2017;148(5):380–9.
52. Grillo F, Pigozzi S, Ceriolo P, Calamaro P, Fiocca R, Mastracci L. Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Histochem Cell Biol.* julho de 2015;144(1):93–9.
53. Nuovo AJ, Garofalo M, Mikhail A, Nicol AF, Vianna-Andrade C, Nuovo GJ. The effect of aging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on the in situ hybridization and immunohistochemistry signals in cervical lesions. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B.* setembro de 2013;22(3):164–73.
54. Karlsson C, Karlsson MG. Effects of Long-Term Storage on the Detection of Proteins, DNA, and mRNA in Tissue Microarray Slides. *J Histochem Cytochem.* dezembro de 2011;59(12):1113–21.
55. Blind C, Koepenik A, Pacyna-Gengelbach M, Fernahl G, Deutschmann N, Dietel M, et al. Antigenicity testing by immunohistochemistry after tissue oxidation. *J Clin Pathol.* 14 de setembro de 2007;61(1):79–83.

JUSTIFICATIVA

Em vista da ausência de referências robustas sobre a preservação de amostras de câncer de colo uterino previamente seccionadas de blocos de parafina e distendidas em lâminas para posterior processamento por imunohistoquímica, desenvolveu-se o presente estudo. Acredita-se que será importante para guiar novos experimentos que ajudem a desvendar a rota da carcinogênese cervical e, no futuro, poder contribuir para o desenvolvimento de métodos que possam qualificar o rastreio, predição de progressão e tratamento do câncer de colo uterino.

OBJETIVOS

Objetivo principal:

- Avaliar a influência do tempo e da temperatura de armazenamento na expressão de P16 e Ki67 em amostras de câncer de colo uterino.

Objetivo secundário:

- Avaliar a expressão de P16 e Ki67 em diferentes amostras de câncer de colo uterino.

ARTIGO EM INGLÊS

Tem-se a intenção de publicar o presente artigo na revista Journal of Pathology

Study of the influence of preparation time and temperature of storage in the immunoreactivity of cervical samples

Cátia Moreira Guterres^{1,2}

Raquel Camara Rivero^{3,4}

Luciano Serpa Hammes^{1,2}

¹ Postgraduate Program in Health Sciences: Gynecology and Obstetrics, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul;

² Hospital Moinhos de Vento

³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

⁴ Federal University of Rio Grande do Sul.

Correspondence to:

Luciano Serpa Hammes

Hospital Moinhos de Vento, Rua Tiradentes, 333/13º andar, Porto Alegre, RS Brasil

CEP 90035-001

E-mail: luciano.hammes@hmv.org.br

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is the fourth most common cancer in women and a major public health problem in the world. Recently, the use of biomarkers to improve the sensitivity and specificity of the screening and diagnosis of this pathology has become more important. Among these, P16 and Ki67 became widely used in immunohistochemistry of samples preserved in paraffin. However, the influence of storage time and temperature of previously cut samples is not known. **Aim:** The aim of this study was to evaluate the influence of preparation time and storage temperature on the immunoreactivity for P16 and Ki67 of cervical specimens. **Methods:** Cervical cancer paraffin blocks were sectioned and mounted onto glass slides in 9, 6, 3, 1 month and zero time and stored at -20 °C, 4 °C and room temperature (RT). All unstained slides of cervical cancer were then processed at the same time by immunohistochemistry for the detection of P16 and Ki67, and the same tumor region was read under the different conditions. **Results:** Of the 10 cases of cervical cancer, 75 regions were analyzed for P16 and Ki67 under different conditions. Expression of P16 and Ki67 did not vary significantly over time at different storage temperature conditions. For example, the 9-month slides showed the following expression when stored at -20°C, 4°C and RT, respectively [median (p25-75)]: P16 - 200 (160-300), 200 (180-300) and 200 (170-300), which was not statistically different from zero time cut, 200 (200-300), $P = 0.210$; Ki 67 - 270 (160-270), 210 (160-270) and 210 (145-270), which was also not statistically different from zero-time cutoff, 240 (180-270), $P = 0.651$. **Conclusion:** There is no significant influence of the preparation time and storage temperature of slides of cervical cancer to be processed by immunohistochemistry later, in the period of up to 9 months, for P16 and Ki67. This allows, when processing slides for HE and / or other markers, we can reserve slides for further processing with P16 and Ki67 without impairing immunoreactivity.

Keywords: immunohistochemistry; aging of blades; biomarkers of cervical neoplasia; P16; Ki67.

Introduction

Estimates for the years 2016-2017 indicated the occurrence of 600,000 new cases of cancer in Brazil. Among them, cervical cancer is among the most frequent, along with breast and bowel cancer. Globally, cervical cancer is the second most common neoplasia affecting women, being the second leading cause of death in this population.¹

Among the screening and diagnosis strategies, cytological and histological exams are involved, which often do not present adequate accuracy. In this sense, biomarkers have been used to qualify these exams, conferring sensitivity and specificity to the methods.²

These biomarkers are usually detected by immunohistochemistry technique in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Often, tissues are tested for different biomarkers, necessitating multiple cuts.

It is understood that tissue samples already cut and distended in slides potentially lose their antigenic capacity with the passage of time, which infers the need for always using recent cuts.^{3,4} This has been a challenge for processing biomarkers panels (when not all can be processed at the same time) or in collaborative studies (where there is a need to send the paraffin block to perform the cut).

Despite the considerable increase in recent years of studies using cervical antigen detection by immunohistochemistry, there are few references to aging of cervical samples and loss of antigenicity.

The P16 and Ki67 proteins are widely used in combination to qualify the diagnosis of cervical cancer since 2010, but we know little about the influence of the storage of pre-cut slides for immunohistochemistry for these biomarkers.⁵

In this way, the present study was developed with the objective of evaluating the influence of preparation time and storage temperature on the immunoreactivity of colon cancer slides analyzed by immunohistochemistry for P16 and Ki67.

Materials and methods

Obtaining samples

Ten samples of uterine cervix cancer obtained from the Department of Pathology of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre were selected, fixed in formaldehyde and preserved in paraffin blocks and were stored for 3-6 years.

These samples were submitted to periodic sections of 4 μm , obtaining slides in the period of 9 months, 6 months, 3 months, 1 month and zero time and preserved at room temperature (RT, around 23°C), 4°C and at -20°C, protected from light. The cuts were performed in duplicate for further immunohistochemical testing for P16 and Ki67.

In the first cut performed, the slide was stained in HE to determine areas of tumor that could be compared later.

Immunohistochemistry

All slides previously cut and stored were processed by immunohistochemistry at the same time for P16 and Ki67. Immunohistochemistry was performed at the University of Texas Health Science Center at San Antonio. For the procedure, unstained slides of formalin fixed paraffin embedded tissue were dewaxed in xylol, rehydrated through various alcohol gradients and finally washed with distilled water. Epitope recovery was obtained by boiling the slides in citrate buffer pH 6.0 for 20 minutes and cooling them for another 20 minutes. Subsequently, the slides were placed in semiautomatic trays to perform immunohistochemistry. (Sequenza, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA).

Immunohistochemistry was performed by avidin-biotin complex (ABC) reaction using Ultravision LV reagents (Labvision Corporation, Fremont, CA, USA) at room temperature, according to the manufacturer's guidelines. Hydrogen peroxide blockade and biotin blockade were used prior to incubation of primary antibody. Subsequently, secondary antibody bound to biotin was applied, followed by streptavidin-peroxidase. Finally, the reaction was developed with the application of

chromogen diaminobenzidine (DAB) for 5 minutes. As a final step, the slides were counterstained with methyl green for 5 minutes, washed in distilled water, dehydrated in alcohol gradients and covered with cover slip.

Negative controls were processed concomitantly by omitting the primary antibody. Positive external controls will be obtained from different tissues.

Obtaining the images

For each case, representative regions of the tumor were previously chosen on the HE slides. These regions were then photographed on slides processed by immunohistochemistry using a Nikon DXM 1200F digital camera microscope with Nikon ACT1 version 2.63 software, white equalization, 300 arbitrary units (AU) of brightness (considered the standard microscope illumination) and 200-fold increase (Nikon; Melville, NY, USA).

The images were originally recorded in RGB color system, JPEG Joint Compression Format (Joint Photographic Experts Group) format in small files (\pm 500KB; 1,280 x 1,024 pixels). Brightness and color balance were initially adjusted according to the actual image viewed by the microscope lenses and were kept exactly the same throughout the image acquisition process.

Manual evaluation

The images were analyzed by a pathologist using the H-score. The percentage of cells in each category of cytoplasmic staining (negative, weak, moderate or strong) was counted and the H-score obtained with the following formula:

$$\text{H-score} = (\% \text{ Cells not stained} \times 0) + (\% \text{ cells weakly stained} \times 1) + (\% \text{ cells moderately stained} \times 2) + (\% \text{ stained cells} \times 3)$$

The final score ranged from 0 to 300, that is, the higher the value, the greater the intensity of staining in a tumor sample.

Results

We analyzed 75 tumor regions for P16 and Ki67 from 10 cases of cervical cancer, which resulted in a total of 1946 images analyzed (in 4 images the marker was not present), according to Table 1.

Table 1. Number of regions analyzed in histological sections of cervical cancer according to temperature and storage time

		Temperature			Total
		-20°C	4°C	RT*	
		P16			
Storage time (months)	9	75	74	75	224
	6	75	75	75	225
	3	75	75	75	225
	1	75	75	73	223
	0			75	75
			KI67		
	9	75	74	75	224
	6	75	75	75	225
	3	75	75	75	225
	1	75	75	75	225
	0			75	75
Total		600	598	748	1946

* RT, room temperature.

The expression of P16 and Ki67 was positive (H score > 50) in 98.5% and 98.8% of cases, respectively.

Table 2 shows the medians and interquartile ranges considering each combination of temperature and storage time for the marker P16. We can identify that the values, regardless of temperature or storage time, are reasonably comparable and are not statistically different.

Table 2. Expression of the P16 marker in unstained slides of formalin fixed paraffin embedded tissue of cervical cancer according to temperature and storage time

		Temperature ^a			P ^c
		-20°C	4°C	RT ^b	
Storage time (months) ^a	9	200 (160-300)	200 (180-300)	200 (170-300)	0,740
	6	200 (160-300)	200 (170-300)	200 (185-300)	0,669
	3	200 (180-270)	200 (170-225)	200 (200-300)	0,053
	1	200 (180-300)	200 (180-262,5)	200 (170-277,5)	0,535
	0	-	-	200 (200-300)	-
P ^d		0,808	0,677	0,189	

^a Median (25-75th percentile); ^b RT, room temperature; ^c Kruskal-Wallis test, comparison among different storage temperatures; ^d Kruskal-Wallis test, comparison among different storage times and all were compared to time zero.

The results for Ki67 are shown in Table 3. In general, label expression is similar across all storage modalities. Unexpectedly, the one-month samples stored at room temperature and 4°C had lower immunoreactivity than -20°C. In addition, the one-month samples at room temperature had lower reactivity than the older samples.

Table 3. Ki67 marker expression in unstained slides of formalin fixed paraffin embedded tissue slides of cervical cancer according to temperature and storage time

		Temperature ^a			P ^c
		-20°C	4°C	RT ^b	
Storage time (months) ^a	9	210 (160-270)	210 (160-270)	210 (145-270)	0,771
	6	190 (150-270)	210 (145-270)	210 (150-255)	0,988
	3	210 (155-270)	200 (150-240)	210 (150-270)	0,585
	1	210 (140-270)	180 (140-240)	180 (140-210)	0,045
	0	-	-	240 (180-270)	-
P ^d		0,769	0,521	0,004	

^a Median (25-75th percentile); ^b RT, room temperature; ^c Kruskal-Wallis test, comparison among different storage temperatures; ^d Kruskal-Wallis test, comparison among different storage times and all were compared to time zero.

In Figure 1 we can see how the histological sections had little variation in immunoreactivity considering the different temperatures and initial and final times.

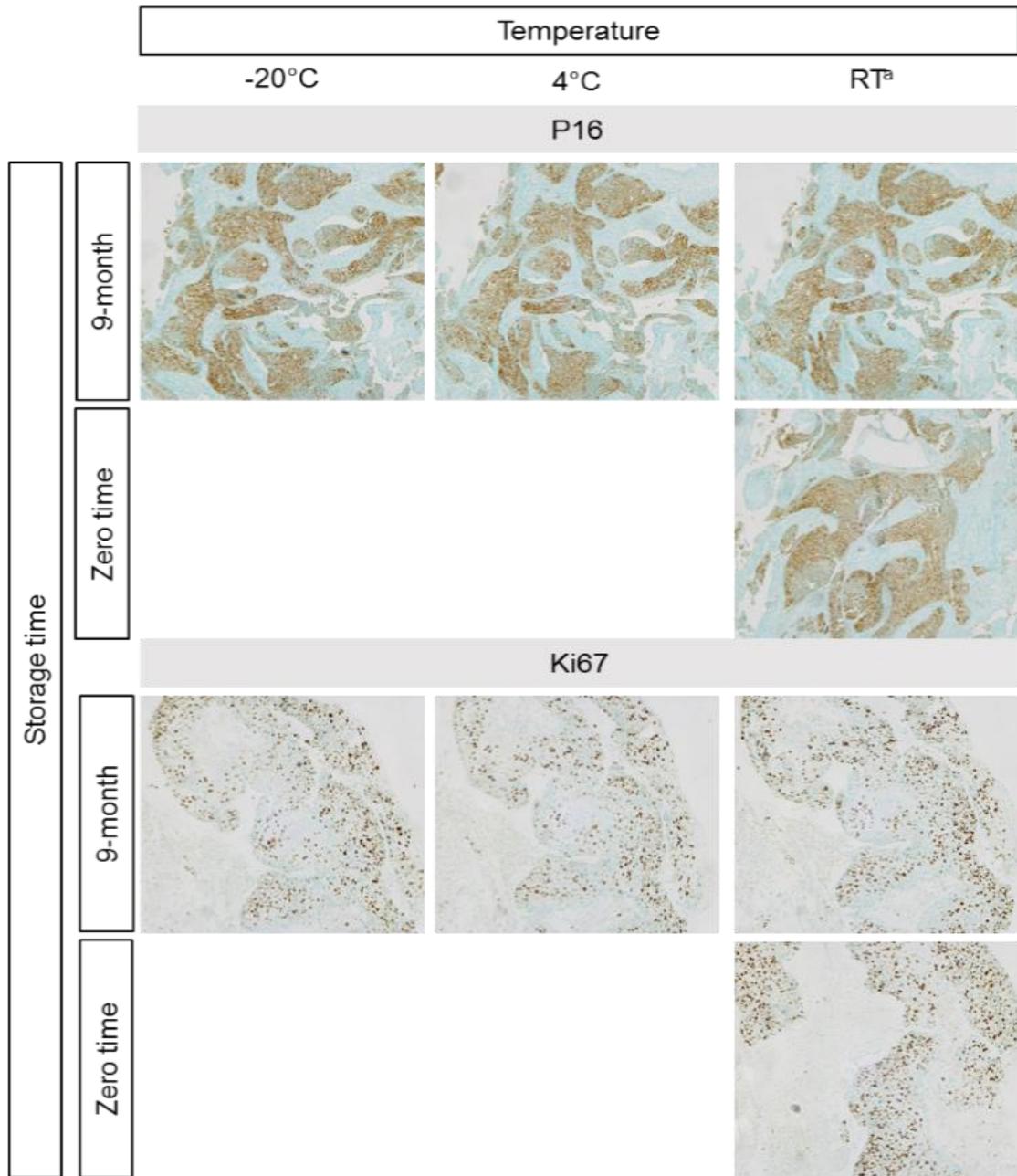


Figure 1. Expression of the marker P16 and Ki 67 in histological sections of 9 months and fresh cut (zero time) under different temperature and storage conditions. ^aRT, room temperature.

Discussion

In the present study we identified that there is no significant influence of the storage temperature of slides with material already cut for immunohistochemistry later, in the period of up to 9 months, for P16 and Ki67. We identified small variations

in the samples with one month of storage, but in general, the samples had a large and consistent immunoreactivity in all storage modalities.

This allows us to consider that, when cutting slides for HE and / or other markers, we can reserve slides for further processing with P16 and Ki67 without impairing immunoreactivity. In collaborative studies, for example, where different samples are obtained in different locations, there would be no need to send paraffin blocks, but rather cut blades.

In a study on immunoreactivity for P16 in cervical intraepithelial neoplasia (CIN), it was evidenced that there is a progressive decrease when comparing samples in periods of 0-1 year vs. 5-7 years vs. 13-15 years with a immunoreactivity score of 92%, 49% and 10%, respectively.⁶ However, it is important to consider that, unlike our study, this study used samples with longer shelf life preserved at room temperature and with different cut thicknesses. Moreover, the study used CIN samples, which have great intra-sample variability of P16 expression.

Other studies using panels of biomarkers and different tissues did not find uniformity in the loss of immunoreactivity. For example, in a study with samples aged for up to 36 months, from different tissues, some markers showed decay (D3, CD31, CD117, estrogen receptor and progesterone, Ki67, p53, TTF-1 and vimentin), while others maintained its stable expression (actin for smooth muscle, keratin 7, 20).⁷

The decrease in the intensity of immunohistochemical staining is observed for other antibodies and other carcinomas, such as p53 and estrogen receptor (ER) in breast carcinomas comparing different times at room temperature. However, other studies have examined different types of antibodies, limited to small samples, with no statistically significant evidence that time influences immunoreactivity.⁸⁻¹¹

We must consider that one of the most important factor that influences the immunoreactivity of the samples is the recovery of the epitopes, which was carried out in our study by boiling the slides in citrate buffer solution pH 6.0 for 20 minutes. In addition, the entire process was performed with reagents and high-quality antibodies. This may have contributed to consistent immunoreactivity in almost all samples and little variation between different types of storage.

Other important factor that results in protein degradation and consequent reduction of immunoreactivity is the poor storage temperature control.¹²⁻¹⁴ In our study there was a careful control of the storage temperature which, even at room temperature, was around 23 °C, which may have contributed to the uniformity of immunohistochemistry.

In addition to storage temperature control, photooxidation may also be associated with loss of immunoreactivity of antigens. Study with 49 biomarkers in veterinary pathology underwent different types of light exposure and concluded that the most favorable method for loss of immunoreactivity was dark storage.¹⁵ In this present study, all samples were preserved protected from light, which we have not been able to detect in other studies.

Our study has some limitations such as not evaluating premalignant lesions and cytology samples, where P16 and Ki67 are also widely used. In addition, our findings are limited to the time of 9 months. In addition, we did not evaluate other markers also used in the cytology and histology of cervical cancer.

In any case, the literature on immunoreactivity of cervical cancer samples is extremely scarce. According to our references, our study is the first to evaluate the maintenance of immunoreactivity in cervical cancer samples for P16 and Ki67.

References

1. INCA,2016. Estimativa,2016 [Internet]. 2017 [citado 19 de outubro de 2017]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>
2. Unger ER, Steinau M, Rajeevan MS, Swan D, Lee DR, Vernon SD. Molecular Markers for Early Detection of Cervical Neoplasia. *Dis Markers*. 2004;20(2):103–16.
3. Bertheau P, Cazals-Hatem D, Meignin V, de Roquancourt A, Vérola O, Lesourd A, et al. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol*. maio de 1998;51(5):370–4.
4. DiVito KA, Charette LA, Rimm DL, Camp RL. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. agosto de 2004;84(8):1071–8.

5. Ziemke P. p16/Ki-67 Immunocytochemistry in Gynecological Cytology: Limitations in Practice. *Acta Cytol.* 2017;61(3):230–6.
6. Nuovo AJ, Garofalo M, Mikhail A, Nicol AF, Vianna-Andrade C, Nuovo GJ. The effect of aging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on the in situ hybridization and immunohistochemistry signals in cervical lesions. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B.* setembro de 2013;22(3):164–73.
7. Grillo F, Pigozzi S, Ceriolo P, Calamaro P, Fiocca R, Mastracci L. Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Histochem Cell Biol.* julho de 2015;144(1):93–9.
8. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 7 de agosto de 1996;88(15):1054–9.
9. Olapade-Olaopa EO, Ogunbiyi JO, MacKay EH, Muronda CA, Alonge TO, Danso AP, et al. Further characterization of storage-related alterations in immunoreactivity of archival tissue sections and its implications for collaborative multicenter immunohistochemical studies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* setembro de 2001;9(3):261–6.
10. Shin HJ, Kalapurakal SK, Lee JJ, Ro JY, Hong WK, Lee JS. Comparison of p53 immunoreactivity in fresh-cut versus stored slides with and without microwave heating. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* março de 1997;10(3):224–30.
11. Wester K, Wahlund E, Sundström C, Ranefall P, Bengtsson E, Russell PJ, et al. Paraffin section storage and immunohistochemistry. Effects of time, temperature, fixation, and retrieval protocol with emphasis on p53 protein and MIB1 antigen. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* março de 2000;8(1):61–70.
12. Grillo F, Bruzzone M, Pigozzi S, Prosapio S, Migliora P, Fiocca R, et al. Immunohistochemistry on old archival paraffin blocks: is there an expiry date? *J Clin Pathol.* novembro de 2017;70(11):988–93.
13. Xie R, Chung J-Y, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, Nakatsuka N, et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* abril de 2011;59(4):356–65.
14. Gelb AB, Freeman VA, Astrow SH. Evaluation of methods for preserving PTEN antigenicity in stored paraffin sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* dezembro de 2011;19(6):569–73.
15. Ramos-Vara JA, Webster JD, DuSold D, Miller MA. Immunohistochemical evaluation of the effects of paraffin section storage on biomarker stability. *Vet Pathol.* janeiro de 2014;51(1):102–9.

PERSPECTIVAS

Em suma, destacam-se algumas observações a respeito do método apresentado, dos tempos e temperaturas de armazenamento das amostras.

Primeiramente, o método manual de avaliação pode ser um tanto subjetivo, pois baseia-se no conhecimento e interpretação de apenas um profissional. Novos estudos podem realizar a mesma análise utilizando ferramentas mais objetivas conforme descritas na literatura comparando com outros a avaliação manual.

Em estudos futuros, maiores tempos de armazenamento podem ser eficazes para comprovar a perda de imunorreatividade dos marcadores p16 e Ki67, assim como realizados com outros marcadores tumorais descritos na literatura.

Finalizando, o presente estudo traz uma indicação que deve-se aumentar a amplitude de estudos, buscando a confiabilidade e a qualidade dos dados imunohistoquímicos.

ANEXO

