



PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA P16^{INK4A} E HLA-G COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DA PROGRESSÃO DE LESÕES CERVICAIS

Daniella Renata Faria (PIBIC/Fundação Araucária/Uem)¹, Vanessa Galdino Araújo Violin¹, Monalisa Wolski Pereira¹, Márcia Edilaine Lopes Consolaro (Co-orientador)¹, Vânia Ramos Sela da Silva (Orientador)¹
e-mail: vaniasela@gmail.com

¹Laboratório de Citologia Clínica/Universidade Estadual de Maringá /
Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas/ Ciências Biológicas II/ Morfologia/ Citologia e Biologia celular

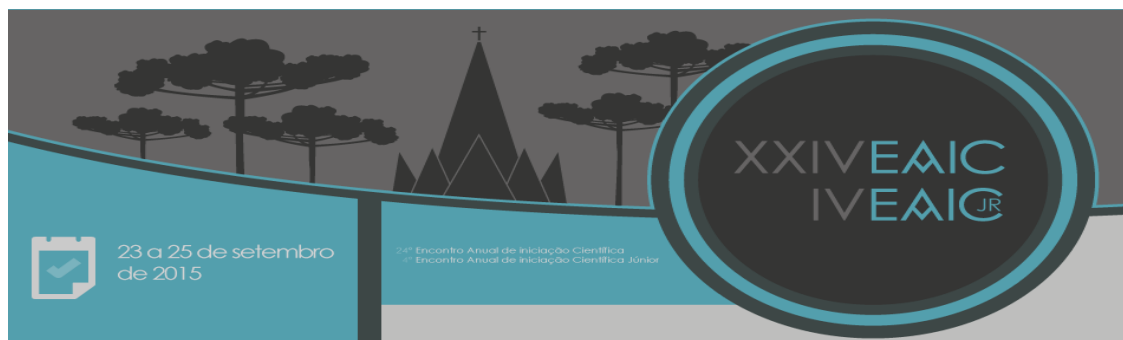
Palavras-chave: Lesões-cervicais, p16^{INK4a}, HLA-G.

Resumo:

O câncer cervical (CC) é uma neoplasia comum em mulheres. A imunohistoquímica para detecção de biomarcadores a fim de complementar o diagnóstico e prever o prognóstico das lesões precursoras vem sendo estudada. Este trabalho teve como objetivo padronizar e validar a técnica de imunohistoquímica para a proteína p16^{INK4}, através do CINtec® p16^{INK4a} Histology kit (MTM Laboratories, Germany) e HLA-G, através de protocolo específico, para avaliação da expressão destes, como possíveis biomarcadores de lesões cervicais. A técnica para a p16^{INK4a}, revelou resultados semelhantes aos descritos na literatura. Na avaliação da expressão do HLA-G, molécula pouco estudada e com grande divergência entre os trabalhos, o protocolo foi elaborado com ajustes nos tempos e diluição do anticorpo primário até apresentar marcação antigênica adequada e menor ocorrência de marcações inespecíficas. Assim, a imunohistoquímica foi padronizada e validada no laboratório de Citologia Clínica, para ambos, p16^{INK4} e HLA-G, e estudos complementares serão realizados para avaliar o potencial destes como biomarcadores em lesões cervicais.

Introdução

O câncer cervical (CC) é a terceira neoplasia mais frequente em mulheres no Brasil (INCA, 2012) e está associado à infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) (CONSOLARO; MARIA-ENGLER, 2012). É precedido por lesões pré-malignas, denominadas de lesões intraepiteliais



escamosas de baixo (LSIL) e alto (HSIL) graus, quando detectadas pela colpocitologia, e classificadas em neoplasia intraepitelial cervical (NIC) I, (equivalente a LSIL) II, III e carcinoma *in situ*, (equivalentes a HSIL), quando diagnosticadas pela histologia. A maioria das lesões iniciais regride, e detectá-las precocemente, bem como identificar sua provável evolução é de extrema importância (CONSOLARO; MARIA-ENGLER, 2012).

A técnica de imunohistoquímica para detecção de biomarcadores, que possam reconhecer as lesões com maior probabilidade de evolução, bem como auxiliar no seu diagnóstico, tem sido estudada. Um biomarcador já bem estabelecido é a proteína p16^{INK4a}, que é uma supressora de tumor, envolvida no ciclo celular, e estudos mostram que sua expressão está aumentada na presença de infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico (CONSOLARO; MARIA-ENGLER, 2012).

A imunidade mediada por células e alterações na expressão dos antígenos leucocitários humanos (HLA), também podem ser fatores relacionados ao desenvolvimento do CC e atualmente biomarcadores imunológicos estão sendo avaliados (ZHENG et al, 2011).

Assim, o objetivo deste estudo foi padronizar e validar a técnica de imunohistoquímica para avaliação da expressão da p16^{INK4a} e HLA-G como possíveis biomarcadores da progressão de lesões cervicais, no laboratório de Citologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Materiais e métodos

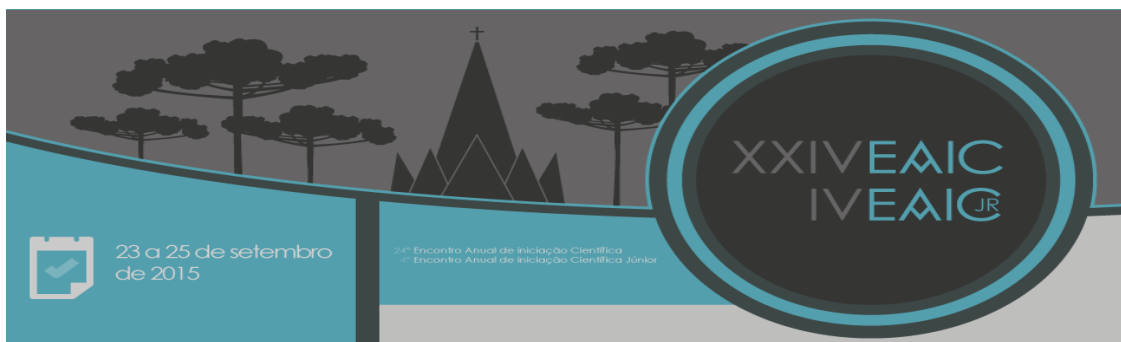
1. Amostra

Foram selecionadas lâminas de biópsias cervicais com os seguintes resultados histopatológicos: 1 normal; 5 NIC I; 3 NIC II; 3 NIC III e 1 CC, para a padronização das técnicas e 1 normal; 10 NIC I; 5 NIC II; 5 NIC III e 1 CC, para validação. As amostras pertencem ao banco do Laboratório Souza Anatomia de Maringá/PR e este projeto fez parte do projeto de pesquisa "Associação entre HPV e expressão de antígenos leucocitários humanos (HLA) classe I e II na progressão de lesões pré-cancerosas cervicais de mulheres do estado do Paraná/Brasil", que foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá.

2. Imunohistoquímica

2.1 p16^{INK4a}

A proteína p16^{INK4a} foi detectada através do CIntec® p16^{INK4a} Histology kit (MTM Laboratories, Germany).



2.2 HLA-G

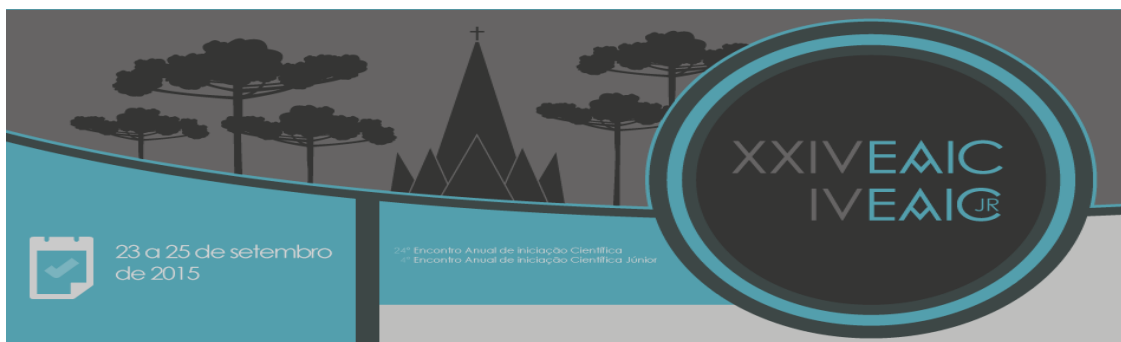
Os cortes foram desparafinizados e reidratados. Após, as lâminas foram colocadas em solução de tampão citrato (pH 6,1) a 94° C para a recuperação antigênica e resfriadas a temperatura ambiente. Foi acrescentada a solução de bloqueio da peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio a 3%) por 15 min com posterior lavagem em PBS. Foi adicionado o reagente “Protein Block” por 10 min e lavado com PBS. As lâminas foram incubadas, *overnight*, em câmara úmida, com o anticorpo primário anti-HLA-G (1:200). Após, foram lavadas com PBS por três vezes e incubadas com anticorpo secundário por 30 min a temperatura ambiente, com o conjugado de avidina-biotina-peroxidase por mais 30 min e por fim, com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por 10 min, para revelação. As lâminas foram lavadas em água destilada e submersas, durante 3 min em hematoxilina de Harris, sendo o excesso retirado em água corrente. Finalmente, foram desidratadas em álcool e diafanizadas em xilol antes da montagem e observadas em microscópio óptico.

Resultados e Discussão

A técnica demonstrou a presença da p16^{INK4a}, conforme a literatura. Dos casos NIC I utilizados na padronização, 60% foram negativos, e 40% mostraram marcação fraca. Entre os NIC II, 67% apresentaram marcação forte e 33% moderada e os casos NIC III demonstraram marcação moderada em 33% e forte em 67%. Já o CC, apresentou coloração fraca e o caso normal foi negativo. Dos casos NIC I utilizados para a validação, 50% foram negativos, 40% apresentaram coloração fraca e 10% forte, enquanto os NIC II, 60% apresentaram coloração moderada e 40% fraca. Nos NIC III, a coloração moderada e forte se mostrou em 40% e a marcação fraca em 20%. Já o caso CC, apresentou coloração forte e o normal foi negativo.

Assim, a marcação para p16^{INK4a}, foi ausente nos casos normais, a maioria ausente ou fraca em NIC I e moderada e forte em NIC II e NIC III, corroborando com os resultados da literatura, onde o aumento da marcação está relacionado à progressão do grau da lesão (GODOY et al. 2008).

Há poucos e controversos estudos avaliando o HLA-G como possível biomarcador. Na padronização da imunohistoquímica deste, as etapas foram realizadas de acordo com um protocolo já existente no laboratório de Citologia Clínica para a detecção de outras proteínas e com a literatura. O protocolo inicial incluiu, 10 min para a etapa de recuperação antigênica, 10 min para o bloqueio da peroxidase endógena, incubação em câmara úmida por 2 h com anticorpo primário anti-HLA-G (1:100), incubação com anticorpo secundário por 10 min e por fim, com o conjugado de avidina-biotina-peroxidase por 15 min, entre outras etapas necessárias. As lâminas foram observadas em microscópio óptico não ocorrendo marcação. Houve reajuste



dos tempos da recuperação antigênica (30 min), bloqueio da peroxidase (15min), incubação com anti-HLA-G (*overnight*), anticorpo secundário (30 min), e com o conjugado revelador (30 min) e as lâminas apresentaram coloração forte. A diluição 1:200 do anti-HLA-G, foi testada seguindo o mesmo protocolo e apresentou melhores resultados, com marcação antigênica adequada e menor ocorrência de marcações inespecíficas. Dos casos NIC I e NIC III utilizados para a validação 60% tiveram marcação forte, 20% moderada e 20% fraca, enquanto os casos NIC II, coloração forte em 80%, e moderada em 20%. O caso CC apresentou coloração forte e o caso normal não apresentou marcação.

Conclusões

Os presentes resultados mostram que a técnica de imunohistoquímica foi padronizada e validada no laboratório de Citologia Clínica, para a p16^{INK4a}, através da utilização do CIntec® p16^{INK4a} Histology kit (MTM Laboratories, Germany) e para HLA-G, através de protocolo próprio. Estudos complementares serão realizados para avaliar o potencial destes como biomarcadores para auxiliar no diagnóstico e prognóstico das lesões cervicais.

Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária - Uem

Referências

1. CONSOLARO M.E.L.; MARIA-ENGLER S.S. **Citologia Clínica Cérvico-vaginal: texto e atlas**. 1ª Ed. São Paulo: Editora Roca, 2012.
2. GODOY A.E.G.; MANDELLI J.; OLIVEIRA F.H.; CALEGARI S.; MOURA L.B.; SERAFINI E.P. **p16INK4 expression in precursor lesion of squamous cell cervical cancer related to the presence of HPV-DNA**. Braz J Med Biol Res., v. 41, n.7, p. 583-588, 2008.
3. **Instituto Nacional do Cancer**. Inca. Brasil: Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/Estimativa/2012/index.asp?ID=5>>
4. ZHENG, N.; WANG, C.X.; ZHANG, X.; DU, L.T.; ZHANG, J.; KAN, S.F, et al. **Up-regulation of HLA-G expression in cervical premalignant and malignant lesions**. Tissue Antigens., v. 77, n. 3, p. 218-24, 2010.