

Imunorreatividade em Material Histológico Arquivado Durante Um, Quatro e Sete Anos

Ana Raquel Dias¹, Carolina Valente¹, Priscila Reis¹, Ana Rute Fernandes^{1,2}, Amadeu Borges Ferro¹

1 - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

2 - Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE

Resumo

Imunorreatividade em material histológico arquivado durante um, quatro e sete anos

Quando aplicada no âmbito da Anatomia Patológica, a imuno-histoquímica tem constituído um poderoso meio de identificação/caracterização de várias estruturas histológicas, permitindo delinear prognóstico e terapêutica para várias patologias. Tendo em conta que as amostras histológicas analisadas podem ser conservadas ao longo de vários anos, interessa avaliar a manutenção da antigenicidade ao longo do tempo, de forma a garantir a qualidade final da técnica quando aplicada em material de arquivo. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi comparar a imunorreatividade do material histológico arquivado durante um, quatro e sete anos.

Foi utilizado material histológico de próstata, pulmão e mama, no qual se procedeu à imunomarcção de citoqueratinas (Clones AE1/AE3), CD34 e proteína p63, por método de múltiplo/HRP no sistema Ventana BenchMark Ultra[®]. Foi realizado um ensaio com recuperação antigénica por alta temperatura (RAAT) e outro sem esta etapa. As imunomarcções (n=162) foram classificadas por três avaliadores independentes num escore quantitativo final (escala 0-100).

O par média/desvio-padrão do escore final para os casos com sete anos foi de 69,06/19,05, para os casos com quatro anos foi de 66,47/20,73 e para os casos com um ano foi de 69,08/19,35, não se tendo encontrado diferenças estatisticamente significativas. Os casos sem RAAT obtiveram um par média/desvio-padrão de 54,90/17,00, enquanto os casos com RAAT obtiveram 81,50/11,60, o que revelou diferenças estatisticamente significativas (p=0,000).

Para os casos em estudo conclui-se que o fator "tempo de arquivo" não está associado a alterações da imunorreatividade. A importância da RAAT na obtenção de imunomarcção de qualidade sai fortemente realçada.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica, blocos de arquivo

Summary

Immunoreactivity in histological material archived for one, four and seven years

When applied within the framework of Pathology, immunohistochemistry has been a powerful means of identification/characterization of various histological structures, allowing to outline prognosis and therapy for various diseases. Given that the analyzed histological samples can be preserved for several years, it is interesting to assess the retention of antigenicity over time in order to ensure the quality of the final technique, when applied to stored material. Thus, the main objective of this study was to compare the immunoreactivity of the histological material archived for one, four and seven years.

It was used histological material from prostate, lung and breast, in which it was performed the immunostaining of cytokeratins (clones AE1/AE3), CD34 and p63 protein by the method of multimer/HRP system on a Ventana BenchMark Ultra[®]. It was conducted a test with heat induced epitope retrieval (HIER) and another one without this step. The stained slides (n=162) were classified by three independent assessors using a quantitative score (scale 0-100).

The pair mean/standard deviation of the score for cases with seven years was 69,06/19,05, for cases with four years was 66,47/20,73 and for cases with one year was 69,08/19,35, which did not revealed any statistically significant differences. The cases without HIER had a couple mean/standard deviation of 54.90/17.00 while the cases with HIER obtained 81.50/11.60, which revealed statistically significant differences (p=0.000).

For this case study it was concluded that the factor archive period is not associated with changes in immunoreactivity. The importance of HIER in obtaining high quality immunostaining comes out strongly highlighted.

Keywords: Immunohistochemistry, archived paraffin blocks

Introdução

Immuno-histoquímica (IHQ) é a designação atribuída ao conjunto de metodologias que recorrem a anticorpos capazes de reconhecer e estabelecer ligação com constituintes tecidulares que se denominam antigênicos. Esta junção permite situar e identificar a presença de várias substâncias por intermédio da cor que é associada aos complexos antigénio-anticorpo entretanto formados (1). Consequentemente, é possível afirmar que a IHQ se apresenta como uma potente ferramenta que permite analisar estruturas celulares e tecidulares que podem estar direta ou indiretamente associadas a patologias (2).

Ao longo dos últimos 20 anos a crescente valorização de diagnósticos diferenciais, prognósticos e indicações terapêuticas em Anatomia Patológica tem acarretado uma evolução progressiva da IHQ, conduzindo a um desenvolvimento das técnicas que permitem demonstração de antígenos em tecido fixado em formaldeído e incluído em parafina (FFIP) (3), principalmente após a introdução dos métodos de recuperação antigénica por alta temperatura (RAAT) que consistem no aquecimento a alta temperatura de cortes histológicos de modo a recuperar a antigenicidade que foi obstruída pela fixação em formaldeído (4, 5, 6).

Estes avanços abriram novas portas no que diz respeito à utilidade do vasto espólio dos arquivos de Anatomia Patológica, pois torna-se agora possível ponderar a sua utilização em estudos retrospectivos de grande porte que, com recurso a amostras populacionais de várias gerações, podem aumentar a compreensão dos mecanismos moleculares da carcinogénese

(7), nomeadamente as consequências de padrões ambientais, alimentares ou de estilo de vida. Apesar de tudo, para se garantir a viabilidade deste manancial de casuística é fundamental avaliar se existe perda ou manutenção da antigenicidade (quantidade de antígeno que se encontra disponível e suscetível de se ligar especificamente a um anticorpo contra ele dirigido) (7) ao longo do tempo de arquivo.

Existem vários estudos que procuram avaliar a manutenção da antigenicidade em lâminas arquivadas contendo cortes de tecidos FFIP, reportando, na sua generalidade, uma diminuição da intensidade de marcação IHQ nas lâminas mais antigas comparativamente a lâminas recentes não arquivadas (8-13). No entanto, quando se procura a mesma informação, mas relativa a tecidos arquivados em bloco, a informação é muito escassa, tendo-se listado somente o trabalho de Litlekalsoy e colegas que, recorrendo a blocos FFIP arquivados até um período de 70 anos, verificou a manutenção da antigenicidade, sendo fundamental a realização de recuperação antigénica por alta temperatura (RAAT) (7).

Numa tentativa de expandir horizontes na área dos estudos retrospectivos, o presente estudo debruça-se sobre a temática da imunorreatividade em cortes obtidos de blocos de tecidos FFIP arquivados. Mais especificamente, pretendeu-se caracterizar as alterações na imunorreatividade em blocos de tecidos arquivados num período de um, quatro e sete anos, através da aplicação da técnica IHQ, com e sem a etapa da RAAT.

Assim, o tempo de arquivo dos blocos histológicos constitui a variável independente e a qualidade dos resultados de IHQ constitui a variável dependente.

Materiais e Métodos

Optou-se por comparar três períodos de arquivo diferentes com curta, média e longa duração, tendo-se operacionalizado estes conceitos nos valores objetivos de um, quatro e sete anos, sendo os casos provenientes dos anos 2010, 2007 e 2004, respetivamente.

Foram selecionados tecidos de mama, próstata e pulmão, pois possuem constituições histológicas díspares e são o alvo das patologias neoplásicas de maior incidência na população mundial (14).

Foram selecionados três blocos histológicos para cada órgão e para cada ano analisados, perfazendo 27 blocos FFIP. A partir de cada um dos blocos histológicos foram obtidas seis secções, visto serem aplicados dois protocolos da técnica IHQ. Assim, no total foram preparadas 162 secções histológicas que se constituíram como unidades de análise (Figura 1). O corte histológico de todos os blocos em estudo foi realizado de forma contínua, tendo sido utilizado o mesmo microtomo e estabelecida como espessura de corte 3 µm.

Os soros primários escolhidos foram o anti-citoqueratina (clones AE1/AE3), o anti-p63 e o anti-CD34.

A técnica IHQ foi realizada no aparelho Ventana BenchMark Ultra® recorrendo-se ao protocolo 1 (IHQ com RAAT) e ao protocolo 2 (IHQ sem RAAT). Com exceção da referida etapa de RAAT, realizada a com a solução ULTRA CC1® baseada em tris e possuindo alto pH, os protocolos foram em tudo idênticos, tendo sido utilizado o método de detecção indireto constituído por múltímero conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP) e tendo como cromogénio a 3,3-Diaminobenzidina.

A avaliação cega das lâminas esteve a cargo de três observadores experientes, independentes e externos à investigação. Quantificou-se a qualidade da marcação IHQ constituindo como metodologia de recolha de dados a observação microscópica com recurso a uma grelha de avaliação que permite atribuir uma pontuação de 0 a 4 pontos aos parâmetros: preservação da morfologia, intensidade da marcação específica, quantidade relativa de estruturas marcadas e marcação inespecífica/fundo.

Posteriormente, foi aplicado às classificações obtidas o algoritmo:

$$[(0,1 \times \text{preservação da morfologia}) + (0,4 \times \text{intensidade}) + (0,25 \times \text{quantidade de estruturas marcadas}) + (0,25 \times \text{marcação inespecífica/fundo})] \times 25 = \text{score final (0-100)}.$$

Desta forma, procura-se garantir que ao maior escore equivale a melhor qualidade de marcação IHQ, podendo tomar valores entre 0 (pior resultado possível em que não há intensidade de marcação, estruturas marcadas ou preservação morfológica, havendo apenas marcação inespecífica que invalida a avaliação) e 100 (melhor resultado possível, implicando preservação perfeita da morfologia, intensidade muito forte, 90 a 100% de estruturas marcadas e ausência de marcação inespecífica).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística através do software informático IBM® SPSS® Statistics. Foram aplicados os testes paramétricos *oneway* ANOVA com post-hoc de Tukey e o teste t para amostras independentes ($\alpha = 0,05$).

Resultados

O par média/desvio-padrão do escore final para os casos com

sete anos foi de 69,06/19,05, para os casos com quatro anos foi de 66,47/20,73 e para os com um ano foi de 69,08/19,35 (Gráfico 1), não se tendo encontrado diferenças estatisticamente significativas após

aplicação do teste *Oneway* ANOVA (Figuras 2, 3 e 4).

Os casos sem RAAT obtiveram um par média/desvio-padrão de 54,90/17,00, enquanto os casos com RAAT obtiveram 81,50/11,60, o que

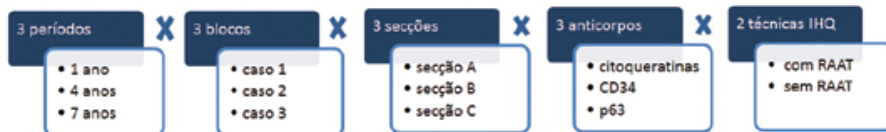


Figura 1. Caracterização das 162 unidades de análise

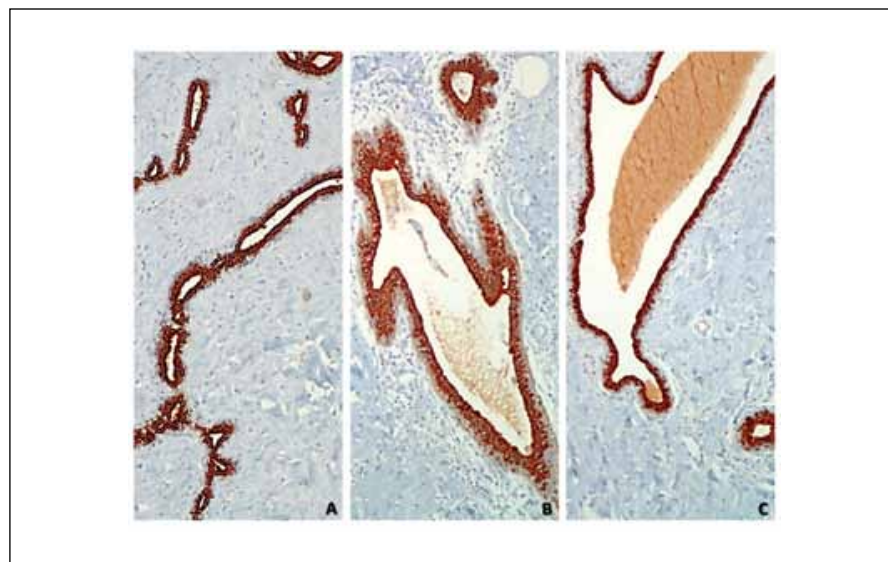


Figura 2. Marcação IHQ de citoqueratinas (clones AE1/AE3) em tecido mamário A – sete anos de arquivo; B – quatro anos de arquivo; C – um ano de arquivo. Ampliação 100X

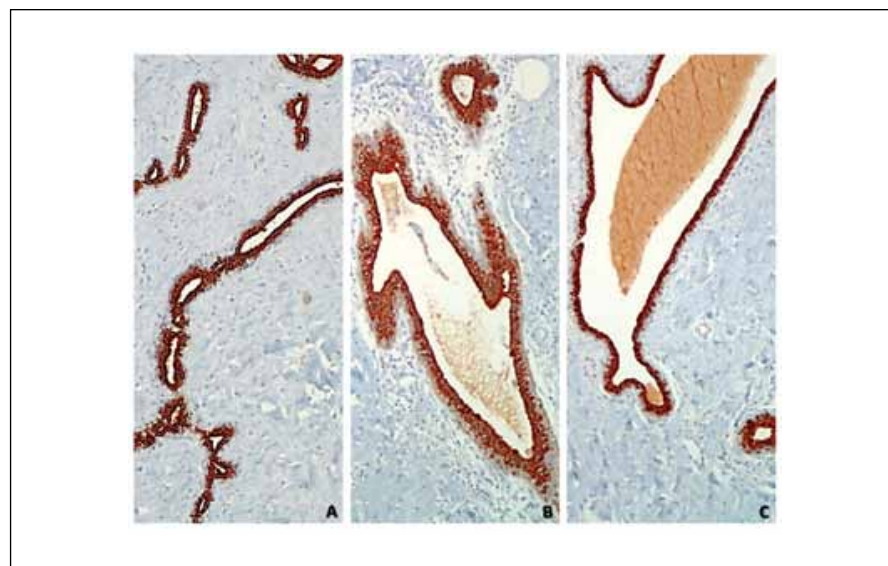


Figura 3. Marcação IHQ de p63 em tecido mamário A – sete anos de arquivo; B – quatro anos de arquivo; C – um ano de arquivo. Ampliação 100X

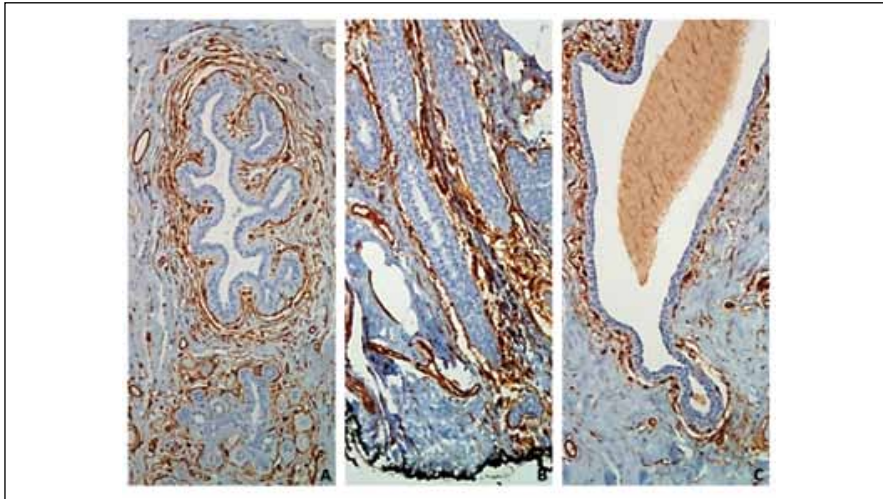


Figura 4. Marcação IHQ de CD34 em tecido mamário
A – sete anos de arquivo; B – quatro anos de arquivo; C – um ano de arquivo. Ampliação 100X

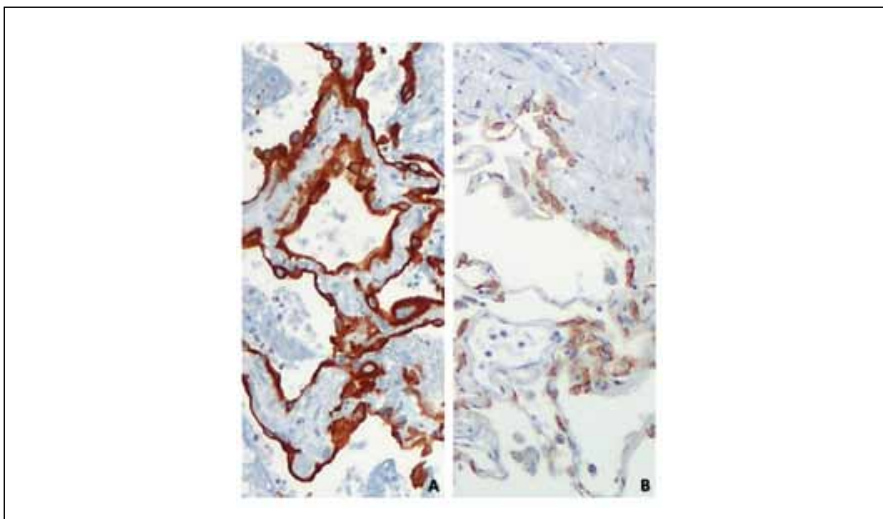


Figura 5. Marcação IHQ de citoqueratinas (clones AE1/AE3) em pulmão
A – com RAAT; B – sem RAAT. Ampliação 100X

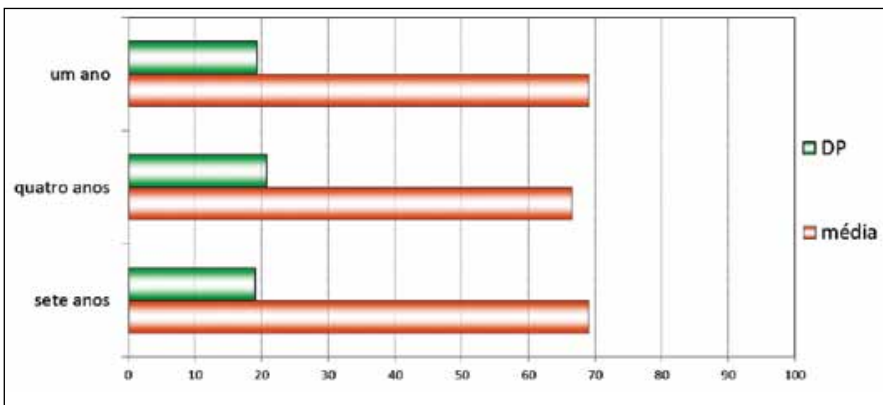


Gráfico 1. Média e desvio-padrão para as diferentes durações de arquivo

revelou diferenças estatisticamente significativas após aplicação do teste t para amostras independentes ($p=0,000$) (Figura 5).

Discussão

Perante os resultados obtidos após comparação dos três períodos de arquivo, verificamos que não existem alterações significativas da qualidade de imunomarcção para ambos os protocolos. Assim, é possível concluir que o fator “tempo de arquivo” não conduz à diminuição da imunorreatividade de cortes histológicos de mama, próstata e pulmão, provenientes de blocos FFIP arquivados há sete anos, quatro e um ano, para os anticorpos anti-CD34, anti-citoqueratinas (clones AE1/AE3) e anti-p63.

Através da comparação da qualidade IHQ entre protocolos com e sem RAAT comprovou-se que os casos sujeitos ao protocolo com RAAT foram classificados com maior pontuação. É então possível afirmar que a RAAT desempenha um papel preponderante na obtenção de resultados de imunomarcção de qualidade com elevada especificidade e sensibilidade, porque permite aos antígenos tecidulares readquirirem a sua conformação tridimensional e, consequentemente, estarem aptos a ser reconhecidos pelos anticorpos incubados (6). Corroborando os resultados da investigação de Litlekalsoy e colegas (7), somente desta forma é possível obter resultados fidedignos que fundamentem estudos retrospectivos fiáveis e robustos em Anatomia Patológica.

As limitações da presente abordagem prendem-se com o número de

blocos FFIP estudados, o qual pode ser considerado reduzido, e ainda o fato de não se ter tido acesso aos dados da fase pré-analítica, que poderiam ter enriquecido sobremaneira o tratamento de dados e respetiva discussão. Desta forma, sugere-se a aplicação do presente protocolo a um número mais alargado e diversificado de casos, anticorpos e tempos de arquivo. Poderá ser também muito útil a realização de estudos prospetivos que analisem a

influência que as diferentes condições de armazenamento de blocos histológicos, nomeadamente a temperatura, têm na perda de antigenicidade.

Agradecimentos

À Direção do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar de Lisboa Norte - Hospital de Santa Maria, em particular à Dra. Cristina Ferreira pela essencial ajuda, tanto na seleção como na avaliação dos casos para o estudo.

À empresa Roche Diagnóstica de Portugal, especialmente ao Dr. José Ruivo que nos facultou todos os reagentes e equipamentos necessários para a realização da técnica IHQ, base fulcral da presente investigação. ✍

Correspondências para:

Amadeu Borges Ferro
amadeu.ferro@estesl.ipl.pt

Referências Bibliográficas

1. Polak J and Noorden S. *Introduction to Immunocytochemistry*. 3^o. Londres : BIOS Scientific Publishers, 2003.
2. Dako. *Immunohistochemical staining methods*. [ed.] G Kumar and L Rudbeck. 5^o Edição. Carpinteria : Dako, 2009.
3. Werner M, Von Wasielewski R and Komminoth P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*. 105: 253-260, 1996.
4. Shi S, Key M and Kalra K. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 39: 741-8, 1991.
5. Shi S, Cote R and Taylor C. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *J Histochem Cytochem*. 45:327-343, 1997.
6. Shi S, Cote R and Taylor C. Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives. *J. Histochemistry & Cytochemistry*. 49: 931-937, 2001.
7. Littlekalsoy J et al. Immunohistochemical markers in urinary bladder carcinomas from paraffin-embedded archival tissue after storage for 5-70 years. *BJU International*. 99 (5):1013-9, 2007.
8. Shin H et al. Comparison of p53 immunoreactivity in fresh-cut versus stored slides with and without microwave heating. *Mod Pathol*. 3: 224-30, 1997.
9. Wester K 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*. 1: 61-70, 2000.
10. van den Broek L and van de Vijver M. Assessment of problems in diagnostic and research immunohistochemistry associated with epitope instability in stored paraffin sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 4: 316-21, 2000.
11. Fergenbaum J et al. Loss of Antigenicity in Stored Sections of Breast Cancer Tissue Microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13: 667-672, 2004.
12. DiVito K et al. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab Invest*. 8: 1071-8, 2004.
13. Jacobs T et al. Loss of Tumor Marker-Immunostaining Intensity on Stored Paraffin Slides of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 15: 1054-1059, 1996.
14. Parkin DM, Ferlay J, Curado MP, Bray F, Edwards B, Shin HR, Forman D. Fifty years of cancer incidence: CI5 I-IX. *Int J Cancer*. 127(12): 2918-27, 2010.