

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ASSOCIAÇÃO DE BIOMARCADORES A LESÕES
INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E RISCO DE PROGRESSÃO**

Luciano Serpa Hammes

Orientador: Prof. Dr. João Sabino Lahorgue da Cunha Filho

Tese de Doutorado

2006

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, especialmente Prof^a Sandra Fuchs, meus sinceros agradecimentos pelo apoio incondicional nestes meses de estágio nos Estados Unidos.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, nominalmente Prof.^a Nadine Clausell, Prof. José Roberto Goldim, Prof.^a Marcia M. Raymundo, Indara Carmanim Saccilotto e Daniela Benzano Bumaguin, agradeço pelo incomparável auxílio no desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas de pesquisa, Prof.^a Adriani Galão, Prof.^a Carla Vanin, Fernanda Azevedo, Jean Matos, Márcio G. Santos, Patrícia Muniz, Renata Pedrini, Valentino Magno e Vera Lúcia Aguiar Braga, meus agradecimentos a vocês pela inestimável ajuda na condução de nossos estudos.

À minha família, sou grato pelo apoio absoluto em todas as etapas de minha carreira.

Aos meus co-orientadores e amigos, Prof. Paulo Naud e Prof.^a Maria Isabel Edelweiss, meus sinceros agradecimentos pelo apoio nesta jornada.

Aos meus orientadores estrangeiros, Prof. Jeffrey E. Korte e Prof. Rajeshwar Rao Tekmal, agradeço pelo acolhimento na Universidade do Texas.

E ao estimado orientador, Prof. João Sabino Lahorgue da Cunha Filho, manifesto minha sincera gratidão por todo o apoio, orientação e ensinamento despendido neste último ano. Muito obrigado, mestre.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	6
2. INTRODUÇÃO	9
3. BIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO	13
3.1. O caráter evolutivo de lesões intraepiteliais cervicais	13
3.2. Associação de lesões cervicais com papilomavírus humano	15
4. BIOMARCADORES	21
4.1. Introdução	21
4.2. Biomarcadores e câncer de colo uterino	22
4.3. Categorias de biomarcadores em investigação para câncer de colo uterino	25
4.3.1. Proliferação	25
4.3.2. Transcrição	26
4.3.3. Adesão	27
4.3.4. Invasão	28
4.3.5. Angiogênese	29
4.3.6. Apoptose	30
4.3.7. Sinalização	31
4.3.8. Inflamação	32
4.4. Uso de imunohistoquímica para pesquisa de biomarcadores cervicais	32
5. JUSTIFICATIVA	35
6. OBJETIVOS	36
6.2. Objetivos Específicos	36

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8. ARTIGO CIENTÍFICO 1	56
8.1. Versão em português.....	57
8.2. Versão em inglês.....	80
8.3. Referências bibliográficas	103
9. ARTIGO CIENTÍFICO 2	108
9.1. Versão em português.....	109
9.2. Versão em inglês.....	136
9.3. Referências bibliográficas	161
10. ARTIGO CIENTÍFICO 3	171
10.1. Versão em português.....	172
10.2. Versão em inglês.....	197
10.3. Referências bibliográficas	220
11. CONCLUSÕES	226
13. ANEXOS	231
13.1. Fator de crescimento endotelial vascular	231
13.1.1. Protocolo.....	231
13.1.2. Descrição técnica do anticorpo primário	234
13.2. Receptor de fator estimulador de colônia de macrófagos	235
13.2.1. Protocolo.....	235
13.2.2. Descrição técnica do anticorpo primário	237
13.3. Ciclooxigenase-2	239
13.3.1. Protocolo.....	239
13.3.2. Descrição técnica do anticorpo primário	242
13.4. CD68	243
13.4.1. Protocolo.....	243
13.4.2 Descrição técnica do anticorpo primário	246
13.5. Termo de consentimento estudo LAMS	246
13.6. Termo de consentimento estudo Biomarcadores	250

1. ABREVIATURAS

Em vista de que alguns termos empregados no texto são melhor reconhecidos por suas abreviaturas em língua inglesa, decidiu-se manter este padrão. Nestes casos, além da descrição da abreviatura em inglês, uma versão em português é apresentada. Os termos aqui empregados estão de acordo com indexação de vocabulário médico (Medical Subjects Headings, MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos.

ABC – reação do complexo de avidina-biotina

CA-125 - antígeno carboidrato 125

CCL2 - *monocyte chemotactic protein 1*, proteína quimioatrativa para monócitos-1

CD68 – glicoproteína transmembrana altamente expressada em macrófagos e suas formas jovens

c-fms – *macrophage colony stimulating factor receptor*, receptor de fator estimulador de colônia de macrófagos

CMYK – *cyan, magenta, yellow and black color system*, sistema de cores baseado em ciano, magenta, amarelo e preto.

COX-2 - ciclooxigenase-2

CSF-1 - *macrophage colony-stimulating factor*, fator estimulador de colônia de macrófagos

DAB - diaminobenzidina

DNA - *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucléico

DP – desvio-padrão

E1, E2, E4, E5, E6 e E7 – *early regions 1-7, regiões precoces 1-7*

EDTA - *ethylenediaminetetracetic acid*, ácido etilendiamino tetra-acético

EGF - *epidermal growth factor*, fator de crescimento epidérmico

FDA – *Food and Drug Administration*, Administração de Alimentos e Medicamentos

FGF - *fibroblast growth factor*, fator de crescimento de fibroblastos

H&E – hematoxilina e eosina

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HPV - papilomavírus humano

HSIL - *high-grade squamous intraepithelial lesion*, lesão escamosa intraepitelial de alto grau

IARC – *International Agency for Cancer Research*, Agência Internacional para Pesquisa em Câncer IHC - imunohistoquímica

IL - interleucina

INK4a - o mesmo que gene supressor tumoral p16

ITGA3 - integrina alfa 3

L1 e L2 – *late region 1 and 2*, regiões tardias 1 e 2

LAMS Study - *Latin America Screening Study*, Estudo Latino-Americano de Rastreamento

LC – *Langerhans' cells*, células de Langerhans

LCR – *long control region*, região longa de controle

LSIL - *low-grade squamous intraepithelial lesion*, lesão escamosa intraepitelial de baixo grau

MCM - *minichromosome maintenance proteins*, proteínas de manutenção minicromossômicas

MMP - metaloproteinase de matriz

MMP-1 - metaloproteinase de matriz tipo 1

MMP-2 - metaloproteinase de matriz tipo 2 ou gelatinase

MMP-3 - metaloproteinase de matriz tipo 3 ou gelatinase B

NFκB - NF-kappaB

NIC – neoplasia intraepitelial cervical

OPR - *open reading frames*, regiões abertas de leitura

P16 - gene supressor tumoral p16

PBS - *phosphate buffered saline solution*, solução salina tamponada fosfatada

PCNA - *proliferating cell nuclear antigen*, antígeno nuclear de proliferação celular

PDGF - *platelet-derived growth factor*, fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE2 – prostaglandina E2

PIGF - *product placenta growth factor*, fator de crescimento placentário

pRB - proteína do retinoblastoma, que em células normais controla ciclo celular

PSA - *prostate-specific antigen*, antígeno prostático específico

P53 – gene supressor tumoral

RGB – *red, green and blue color system*, sistema de cores baseado em vermelho, verde e azul

RNA - *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico

SCC – *squamous cell carcinoma*, carcinoma de células escamosas

SRC kinase - *Rous sarcoma kinase*, quinase do sarcoma de Rous

TA – temperatura ambiente

TAM - *tumor associated macrophages*, macrófagos associados a tumor

TGF- β - *transforming growth factor beta*, fator transformador de crescimento beta

TNF - *tumor necrosis factor*, fator de necrose tumoral

UTHSCSA – *University of Texas Health Science Center at San Antonio*, Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas em San Antonio

VEGF – *vascular endothelial growth factor*, fator de crescimento endothelial vascular

v-fms – *feline sarcoma retrovirus oncogene*, oncogene retroviral de sarcoma felino

VIA – *visual inspection with acetic acid*, inspeção visual com ácido acético

VILI – *visual inspection with Lugol's iodine*, inspeção visual com Lugol

2. INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia que mais afeta mulheres no mundo todo, somente sendo ultrapassado pelo câncer de mama, e é o quinto tipo de tumor mais prevalente quando homens e mulheres são considerados juntos. Em 2006, cerca de meio milhão de mulheres serão acometidas pela doença e, destas, 250.000 morrerão.¹⁻³ Diferentemente da média de idade em que ocorre câncer de mama, pulmão e ovário, o câncer de colo uterino acomete mulheres muitos anos antes, em torno da quinta década de vida. Proporcionalmente, o câncer de colo uterino ocasiona mais perda de anos-vida do que qualquer outro tumor.²

Em muitos países em desenvolvimento, o câncer de colo uterino é ainda mais prevalente que o câncer de mama, sendo a primeira causa de morte. América Latina, África e sul e sudeste asiático são as regiões que apresentam as maiores taxas de incidência e mortalidade da doença. Os países em desenvolvimento em conjunto, como o Brasil, representam 80% de todos os casos. Paradoxalmente, somente 5% dos recursos destinados a este tipo de câncer são reservados aos países em desenvolvimento.²⁻⁴

O câncer de colo uterino é uma doença altamente relacionada com o grau de desenvolvimento socioeconômico. As maiores incidências de câncer de colo uterino nas Américas ocorrem no Haiti (91 casos por 100.000 mulheres/ano), Nicarágua (61,1) e Bolívia (58,1), enquanto as menores incidências ocorrem obviamente nos Estados Unidos (7,8) e Canadá (8,2). Não só a incidência, mas também o estágio dos tumores no momento do diagnóstico é associado ao grau de desenvolvimento do país. Grande parte

dos casos diagnosticados na América Latina está em estágio II ou III, enquanto a maioria dos casos nos Estados Unidos é diagnosticada em estágio I.⁵

No Brasil, estima-se que cerca de 21.000 mulheres foram acometidas pelo câncer de colo uterino em 2005. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de colo do útero é a neoplasia mais incidente na região Norte (23 casos por 100.000 mulheres/ano). Nas regiões Sul, Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste, o câncer de colo uterino representa o segundo tumor que mais acomete mulheres, com incidência de 31, 23, 22 e 18 casos por 100.000 mulheres/ano, respectivamente.⁶

Apesar da alta incidência de câncer de colo uterino, esta é uma doença passível de rastreamento e cura. O primeiro passo em direção ao controle do câncer de colo uterino foi dado por Hans Hinselmann, médico alemão, que em 1921 desenvolveu um aparelho capaz de detectar lesões cervicais incipientes através do uso de potentes lentes de aumento, o colposcópio. Ao invés de esperar que as lesões tornassem-se extensas, visíveis a olho nu, Hinselmann era capaz de identificá-las precocemente e tratá-las com melhor prognóstico para as pacientes.⁷

O segundo grande passo no combate ao câncer de colo uterino foi dado por Papanicolau em 1943, quando evidenciou que por meio de raspado cervical era possível rastrear células para displasias. Assim, poderia identificar alterações cervicais ainda mais precocemente que o método de Hinselmann.⁸ Rapidamente vários países assumiram o rastreamento cervical baseado na citologia de Papanicolau e aqueles que efetivamente desenvolveram programas de rastreamento organizados conseguiram reduções drásticas na incidência e mortalidade por tumores cervicais.^{9,10}

No início da década de 70, outra descoberta importante iria mudar o rumo do controle do câncer cervical: a sua associação com papilomavírus humano (HPV). Zur Hausen, Meislen e Fortin publicariam uma série de artigos em que descrevem a relação de HPV,

coilocitos e displasia leve em citologia cervical, mas ainda demoraria-se uma década para que os primeiros subtipos de HPV associados à oncogênese fossem isolados de amostras cervicais.¹¹

A história do câncer de colo uterino teria seu grande marco na data de 8 de junho de 2006 quando foi aprovada pelo órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA) a primeira vacina para prevenção desta doença.¹²

Apesar do desenvolvimento das vacinas contra o HPV, o câncer de colo uterino provavelmente continuará sendo uma realidade em nosso meio pois a vacinação possivelmente não estará disponível para todas as mulheres em vista do seu alto custo, vários subtipos oncogênicos ainda não estão cobertos pela vacinação e, ainda, mesmo se a vacina fosse eficaz em 100% dos casos de infecção pelo HPV, teríamos que esperar 60 anos para que a última mulher infectada pelo HPV viesse a morrer de câncer de colo uterino.¹³⁻¹⁶

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. Nosso conhecimento atual alcança até o processo de interação das proteínas virais E6 e E7 com o genoma humano, a partir daí as informações são extremamente fragmentadas e pontuais. Sabemos que o HPV infecta as células, muda o seu fenótipo, mas o mecanismo que faz algumas células progredirem para câncer ainda é completamente obscuro.

Com o conhecimento de importantes etapas no processo de malignização da cérvix uterina, poderíamos identificar quais pacientes estão em risco de apresentar progressão de lesões pré-tumorais e assim evitarmos milhões de tratamentos desnecessários que são realizados anualmente, poderíamos criar drogas específicas que preveniriam o câncer de colo uterino mesmo em pacientes infectadas pelo HPV e, ainda, poderíamos

melhorar a qualidade do rastreamento cervical com a adição de alvos moleculares a serem identificados.

Foi justamente com este objetivo de estudar fatores associados (biomarcadores) a lesões cervicais e sua progressão que realizamos o presente estudo. Nas páginas seguintes, é apresentado uma breve revisão da literatura e, a seguir, três artigos que enfocam este estudo da carcinogênese cervical. O primeiro artigo é consideravelmente técnico, onde apresenta-se uma nova técnica para leitura automatizada de lâminas de imunohistoquímica (IHC) de marcador tumoral para cérvix. O segundo artigo refere-se à análise de potenciais marcadores de angiogênese e risco de progressão das lesões cervicais: fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), receptor de fator estimulador de colônia de macrófagos (*macrophage colony stimulating factor receptor*, c-fms) e ciclooxigenase-2 (COX-2). Por fim, o terceiro artigo refere-se à interação das lesões displásicas e neoplásicas com macrófagos, mostrando como os tecidos subjacentes e inclusive as células do sistema imunológico são importantes para o desenvolvimento do tumor.

3. BIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO

3.1. O caráter evolutivo de lesões intraepiteliais cervicais

O câncer de colo uterino é uma doença que se caracteriza inicialmente pela infecção pelo papilomavírus humano, evolução lenta por estágios pré-malignos, denominados de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), até chegar à forma invasora. Várias evidências comprovam este caráter evolutivo do câncer cervical: (a) na maioria dos casos, NICs ocorrem pelo menos uma década antes da forma invasora e, se tratadas, reduzem drasticamente a incidência da neoplasia de colo uterino; (b) mulheres com estas anormalidades epiteliais desenvolvem câncer mais facilmente que mulheres que as não as apresentam; (c) em torno de carcinomas em estágios iniciais, invariavelmente são encontrados extensos focos de carcinoma *in situ*; (d) evidências bioquímicas e morfológicas indicam similaridades entre o epitélio displásico e o francamente neoplásico; (e) estudos epidemiológicos indicam que as NICs e lesões invasoras desenvolvem-se nos mesmos grupos e possuem fatores de risco semelhantes; (f) estudos prospectivos evidenciam a regressão, persistência e progressão das lesões.^{17,18}

Em termos gerais, as lesões pré-malignas são divididas em NIC 1, NIC 2 e NIC 3, de acordo com a gravidade e espessura do epitélio acometido pelas células displásicas. NIC 1 também é considerado lesão intraepitelial de baixo grau (*low-grade squamous intraepithelial lesion*, LSIL) e NIC 2 e 3 são agrupados em lesão escamosa intraepitelial de alto grau (*high-grade squamous intraepithelial lesion*, HSIL).^{19,20}

A incidência de NICs é extremamente maior que a do próprio câncer, mas não existem estimativas oficiais da prevalência destas lesões. Em estudo que envolveu coletas em Porto Alegre, Campinas, São Paulo e Buenos Aires, Estudo Latino-Americano de Rastreamento (*Latin America Screening Study, LAMS Study*), com mais de 12.000 mulheres rastreadas para câncer de colo uterino, a prevalência de LSIL variou de 1.300 a 1.860 casos /100.000 mulheres, enquanto HSIL apresentou prevalência de 990 a 1.180 casos / 100.000 mulheres. Estudos semelhantes de rastreamento populacional em países em desenvolvimento têm demonstrado resultados similares ou com prevalência ainda maior de lesões pré-malignas.²¹⁻²³

A grande maioria das NICs não irá progredir para câncer. Em uma avaliação dos estudos relevantes publicados entre 1952 e 1992, estimou-se que 10% dos casos de NIC 1 irá progredir para NIC 3 e somente 1% teria o risco de evoluir para carcinoma invasor.¹⁸ Posteriormente, em uma metanálise mais recente, estimou-se que 21% dos casos de NIC 1 progredirá para HSIL e somente 0,15% irá evoluir para carcinoma.²⁴ Dados do *LAMS Study*, referentes a 3.042 pacientes rastreadas no Hospital de Clínica de Porto Alegre (HCPA), demonstram que após 2 anos de seguimento, pacientes com LSIL apresentaram 80% de regressão, 13,33% de persistência e 6,67% de evolução para HSIL ou carcinoma.²⁵

O manejo das lesões de alto grau, na imensa maioria das vezes, baseia-se no tratamento imediato em vista do risco de progressão para estágios invasores. Em termos gerais, as diferentes modalidades de tratamento, conização com bisturi, crioterapia, abrasão com laser ou alça diatérmica, não apresentam significativas diferenças em termo de persistência ou resolução das lesões.²⁶

Por outro lado, o tratamento sistemático de todas as lesões de baixo grau, acarretaria uma terapêutica desnecessária em 80-90% das pacientes, já que a maioria das lesões não progredirá para graus mais elevados. Vários fatores têm sido associados ao risco de

progressão: infecção por determinados subtipos de HPV como 16 e 18, persistência da lesão, tabagismo, imunodeficiência, co-infecções genitais por doenças sexualmente transmissíveis, idade, uso de anticoncepcionais orais, entre outros.²⁷⁻³⁴ Entretanto, apesar dos vários fatores de risco já identificados, a seleção de que pacientes devem ou não receber tratamento é um assunto passível de discussão, pois não dispomos de nenhum fator de risco objetivo que apresente um prognóstico claro das lesões de baixo grau. Na maioria das vezes as pacientes acabam recebendo tratamento para lesões que iriam involuir espontaneamente, ocasionando desconforto, ansiedade e custos desnecessários para os programas de rastreamento, ainda mais em países em desenvolvimento onde a incidência da doença é maior e os recursos infinitamente menores.^{33,35-37}

3.2. Associação de lesões cervicais com papilomavírus humano

Em 1974, as primeiras tentativas de identificar a presença de papilomavírus humano (HPV) em tecido tumoral foram publicadas por zur Hausen e colaboradores. Posteriormente em 1976, Meislen e Fortin descrevem pela primeira vez a associação de HPV, coilócitos e displasia leve em citologia cervical. Quase uma década depois, os primeiros subtipos de HPV associados à oncogênese foram isolados de amostras cervicais, HPV 16 em 1983 e HPV 18 em 1984.¹¹

O primeiro grande estudo epidemiológico, envolvendo amostras enviadas por 22 países, relatou associação de HPV e câncer de colo uterino em 93% dos casos.³⁸ Entretanto, posteriormente, re-analisando com melhores procedimentos os casos negativos deste estudo e excluindo as amostras inadequadas, a prevalência de HPV entre os casos de câncer alcançou 99.7%.³⁹

Novos subtipos de HPV são descritos a cada ano, sendo numerados em ordem de descoberta e variando apenas 2-5% da carga genética entre um subtipo e outro. Em termos gerais, os subtipos de HPV são agrupados em alto-risco, freqüentemente associado com tumor invasor, e baixo-risco, encontrado em verrugas genitais.⁴⁰

Em 2003, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Cancer Research, IARC*) publicou uma nova classificação dos subtipos de HPV de acordo com dados de quase 4.000 pacientes, associando dados epidemiológicos e análise de ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid, DNA*). Dos 106 subtipos de HPV descritos até o momento do estudo, 15 subtipos foram identificados como alto-risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), 3 foram classificados como prováveis alto-risco (26, 53 e 66) e 12 foram denominados baixo-risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81, e CP6108), sendo o restante dos subtipos de HPV não identificados na cérvix uterina.⁴¹ Outros estudos de classificação do HPV são semelhantes ao estudo da IARC, com pequenas variações.⁴⁰

Papilomavírus são relativamente pequenos e infectam preferentemente epitélio de mucosas e pele. Seu DNA é disposto de forma circular, em dupla hélice, com aproximadamente 7.200-8.000 pares de bases.⁴² O genoma do HPV é dividido em oito regiões abertas de leitura (*open reading frames, OPR*), seis consideradas precoces (*Early*: E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e duas denominadas tardias (*Late*: L1 e L2), nomeadas de acordo com a fase em que são expressadas na replicação viral (figura 1).⁴² Adicionalmente, ainda é descrito uma região entre L1 e E6 denominada região longa de controle (*long control region, LCR*).¹¹

Cada OPR possui uma função diferenciada durante a infecção viral. E1 e E2, por exemplo, são responsáveis pela transcrição e replicação viral, sendo altamente conservadas em todos os subtipos de HPV.⁴² LCR, por exemplo, não codifica proteínas, mas também regula a replicação e transcrição viral através de seus sítios de ligação que

são ativados por fatores de transcrição celular.⁴² L1 e L2 são responsáveis pela codificação do capsídeo que irá abrigar o genoma viral quando o HPV for transportado de uma célula para outra.⁴³

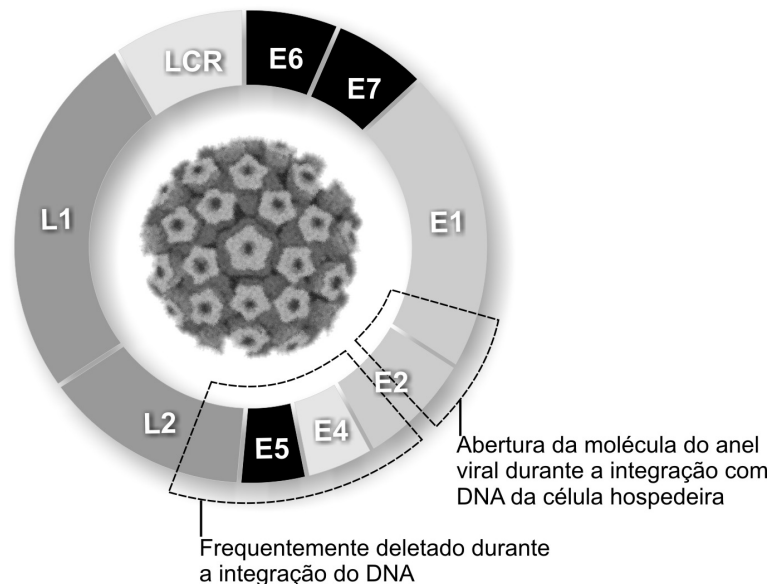


Figura 1. Representação esquemática do DNA do papilomavírus humano. ¹¹

No desenvolvimento do tumor, o vírus rompe seu genoma circular na região de E2 para integrar-se ao DNA da célula hospedeira. Em vista desta quebra do genoma, parte da região E2 e de regiões vizinhas como E4, E5 e L2 são regularmente deletadas. Das regiões restantes do genoma viral, E6 e E7 desempenham papel importante na oncogênese viral (figura 1).^{11,44}

E5 tem sido associada ao estímulo celular no início da infecção, promovendo a expressão de diversos oncogenes e bloqueando a apoptose celular. Por exemplo, E5 age no receptor do fator de crescimento epidérmico, estabilizando-o e, assim, impossibilitando-o de ser degradado ciclicamente. Como resultado, este receptor de superfície tem sua sinalização aumentada, provocando indução de proliferação celular. E5 ainda pode ativar oncogenes nucleares como c-jun, junB e c-fos e inibir a proteína p21, gen supressor tumoral, em cultura de fibroblastos.⁴⁵ Postula-se que a ação do gene

E5 é inicial e, à medida que a replicação celular intensifica-se, com replicação do genoma viral integrado ao celular, o gene E5 é deletado, não sendo mais encontrado em estágios invasores da doença.¹¹

Os genes E6 e E7, por outro lado, possuem um papel mais importante e consistente na transformação maligna da cérvix uterina, estando presente desde estágios iniciais até lesões avançadas. Apesar de na maioria das vezes serem expressos simultaneamente, E6 e E7 independentemente podem imortalizar células em experimentos *in vivo*.^{11,42-44,46}

E6 interage com P53, gene supressor (anti-oncogene) que células normais expressam para controle do ciclo celular. P53 normalmente mantém a estabilidade do genoma corrigindo erros na transcrição do DNA ou, quando o erro não é corrigido, estimulando apoptose imediata. Entretanto, na presença de E6, P53 perde seu efeito, resultando em imortalização celular e instabilidade genética. Adicionalmente, a ação de E6 não se restringe somente à imortalização celular, mas também ao estímulo de proliferação por várias vias bioquímicas. Entre elas, tem sido descrito interação com telomerase e quinase do sarcoma de Rous (*Rous sarcoma kinase*, SRC kinase).^{11,42} Adicionalmente, estudos preliminares mostram que E6 também tenha interação na expressão de VEGF e na proteína de inibição da apoptose e controle de divisão celular, survivin.^{45,47,48}

O gene viral E7 age de maneira semelhante a E6, mas interage com a proteína do retinoblastoma (pRb), outro importante anti-oncogene que controla o ciclo celular em células normais. Como produto, também promove que a célula acumule lesões genéticas e desenvolva um fenótipo maligno.^{11,44} Além de pRb, E7 interage diretamente com outros supressores do crescimento celular como p21 e p27.⁴⁹ E7, assim como E6, têm sido implicados também em alteração direta na expressão de fatores angiogênicos, independente da alteração genética na célula hospedeira.⁵⁰

Em contraste, as proteínas E6 e E7 produzidas por HPV classificados como baixo risco fracamente interagem com P53 e pRb e, quando interagem, aparentemente não se integram ao genoma do hospedeiro.^{11,44}

O ciclo do HPV é intimamente relacionado à diferenciação celular do epitélio. Na cérvix normal, o epitélio cresce em camadas estratificadas onde somente as células das camadas basais são capazes de ativamente dividirem-se. Após a divisão, uma das células permanece na camada basal enquanto a outra inicia o processo de migração para camadas superiores, interrompendo o ciclo celular, diferenciando-se e passando a produzir queratina. O HPV inicia seu processo de infecção exatamente pelas camadas basais, onde a divisão celular é intensa, ocasionando que a replicação viral ocorra junto com a divisão celular. Inicialmente o número de cópias de HPV DNA é baixo nas células infectadas, mas à medida que as células infectadas migram para camadas mais externas do epitélio, a quantidade de material genético do HPV é extremamente amplificada. Nas camadas celulares superficiais, o DNA viral é encapsulado em capsídeos e o vírus é liberado da célula para infectar novos hospedeiros.⁴²⁻⁴⁴

Esse processo poderia ocorrer normalmente, sem dano à célula hospedeira, caso o genoma original da célula fosse mantido. Entretanto, o HPV continuamente estimula a divisão celular e, por meio das proteínas E6 e E7, permite o acúmulo de mutações genéticas que finalmente levam ao câncer. Além disso, o fenótipo invasor da célula hospedeira também pode ser dependente diretamente da integração do genoma viral com o genoma humano, permitindo também intensas mutações oncogênicas.⁴⁶

Em contraste com o entendimento do processo inicial de infecção pelo HPV e como este interage com o ciclo celular, descrito detalhadamente até aqui, o conhecimento dos eventos moleculares que se seguem é extremamente limitado.^{46,51} 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. Entretanto, pouco sabemos como as células displásicas e neoplásicas controlam estes eventos, levando por fim ao câncer invasor. O conhecimento atual é fragmentado, baseado apenas nos eventos iniciais que a infecção pelo HPV causa, e centenas de vias bioquímicas necessitam ainda ser desvendadas.⁵²⁻⁵⁴

No processo de investigação dos mecanismos moleculares que regulam a vida das células transformadas pelo HPV, etapas importantes deste processo devem ser elucidadas através da compreensão de proteínas importantes no processo de transformação maligna da cérvix uterina, chamados comumente de biomarcadores.

4. BIOMARCADORES

4.1. Introdução

Durante as últimas décadas, um investimento considerável tem sido realizado na detecção precoce do câncer, identificação de fatores de risco de progressão e recidiva, além do descobrimento de alvos terapêuticos nas rotas bioquímicas do processo de oncogênese. Estes estudos baseiam-se, na grande maioria das vezes, em investigação de marcadores tumorais, idealmente que existam somente na presença do tumor e ausentes em indivíduos saudáveis. Esses marcadores tumorais, também chamados de biomarcadores, são proteínas, enzimas ou oncogenes, que podem ser identificados por diferentes técnicas em tecidos e fluídos corporais.^{51,53-55}

O primeiro teste reconhecido com biomarcador para tumor data de 1965, quando Joseph Gold identificou uma substância denominada antígeno cárcino-embriônico no sangue de pacientes com câncer de cólon, a qual era normalmente só encontrada em tecidos fetais.⁵⁶ Posteriormente, outros biomarcadores, como antígeno carboidrato 125 (CA-125) para câncer de ovário, passaram a ser empregados na década de 80.⁵⁷

O biomarcador mais utilizado na atualidade é o antígeno prostático específico sérico (*prostate-specific antigen*, PSA), utilizado amplamente na última década para rastreamento de câncer de próstata. Sua utilização trouxe um dramático aumento no número de diagnósticos precoces e, por conseguinte, melhor prognóstico.⁵⁶

Apesar do sucesso de alguns biomarcadores em determinadas neoplasias, em câncer de colo uterino não dispomos até o momento algum 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.^{51,52,55}

4.2. Biomarcadores e câncer de colo uterino

A revelação dos mecanismos que se seguem à infecção pelo HPV é um grande desafio. Na maioria dos casos, este é um processo benigno com proliferação celular sem dano ao hospedeiro, mas ocasionalmente pode promover o desenvolvimento de NIC e câncer. Nos casos em que ocorrem NIC, não só alterações estruturais nas células podem ser identificadas, mas também importantes alterações funcionais estão presentes.⁵¹

A patogênese viral pode ser resumida em dois desfechos simples, excludentes entre si: a) a infecção ocorre efetivamente e a célula hospedeira completa todos os estágios de malignização com sucesso e transforma-se em doença invasora ou b) a infecção não consegue promover malignização porque houve falha na infecção celular pelo vírus, porque a infecção causou morte celular ou porque, mesmo com a infecção, não há replicação viral.⁵¹

O entendimento das vias bioquímicas da carcinogênese pode levar ao desenvolvimento de drogas terapêuticas que ajam exatamente em uma determinada etapa do processo de malignização e assim interrompê-lo. Como exemplo, tem sido descrito um aumento da expressão de COX-2 à 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. De fato, estudos iniciais mostraram 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.⁵⁸⁻⁶²

Não só as alterações intrínsecas ao tumor podem ser observadas no estudo de biomarcadores, mas também nos tecidos adjacentes ao tumor. A intensa presença de macrófagos em tecidos tumorais e estroma, por exemplo, tem sido associada ao grau de gravidade de vários tumores e pior prognóstico.⁶³ Por conseguinte, pode-se supor que o bloqueio de alguns passos da interação tumor-macrófago possa promover o controle do crescimento tumoral. Realmente, a remoção de macrófagos em ratos com câncer de mama, por meio do bloqueio da produção de fator estimulador de colônia de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*, CSF-1), produziu uma acentuada redução no crescimento tumoral e metastatização.⁶⁴

Além dos biomarcadores revelarem possíveis alvos de novos tratamentos, provavelmente a grande utilidade de marcadores tumorais em carcinogênese cervical seja em prognóstico de lesões pré-malignas. É certo que a maioria das lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau não progredirá para lesões mais graves, mas como selecionar quais progredirão? Conforme já discutido previamente, como resultado desta falta de fator prognóstico, temos um tratamento excessivo de lesões que nunca iriam progredir para forma invasora, gerando custos e desconforto às pacientes.⁵³ A detecção de NIC de baixo grau associada a fatores de risco objetivos (biomarcadores) poderia possibilitar ao ginecologista tratamento efetivo imediato, ou, na ausência destes, apenas o acompanhamento rotineiro da paciente.⁶⁵ Utilizar como parâmetro apenas a infecção pelo HPV (que não é disponível para a maioria do sistema público de saúde), imunodeficiência

(que não existe na maioria dos casos que tratamos) e persistência da lesão (levando em conta que em saúde pública é difícil o acompanhamento), restringe a capacidade de tomada de decisão frente a casos de displasia cervical.

Entretanto, a grande maioria dos estudos não acessa em análise multivariada outros fatores de risco já estabelecidos para risco de progressão como HPV de alto risco, persistência da lesão, existência de imunodeficiência e idade da paciente, o que dificulta ainda mais o nosso processo de busca de um biomarcador ideal.^{33,35-37}

Em uma clara demonstração do impacto do descobrimento de um biomarcador efetivo em avaliar o risco de progressão de NIC, um recente artigo indica que a adição do uso de identificação de Ki-67 e pRb no manejo de pacientes com lesão até NIC 2 ocasionaria uma diminuição de cerca de 20.000 tratamentos desnecessários por ano na União Européia. É importante lembrar que as taxas de prevalência de lesões intraepiteliais cervicais (172/100.000 mulheres) na União Européia são infinitamente menores que as nossas, o que indica que o uso de biomarcadores seria ainda mais útil em nossa realidade de país em desenvolvimento.⁵²

Além do uso de biomarcadores como prognóstico, seja de lesões intraepiteliais ou de recidivas após tratamento, eles também 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.⁶⁶ Entretanto, é trabalhoso, requer um grupo qualificado de citotécnicos e patologistas, e depende intimamente da observação humana das alterações citológicas. O uso de um marcador específico de lesões seria extremamente útil para acrescentar objetividade à citologia cervical.⁵⁵

Enfim, como claramente ilustrado por Syrjanen, 2005, existe uma necessidade urgente de marcadores mais específicos da carcinogênese cervical capazes de avaliar o risco de

progressão de lesões em pacientes individualmente, que também possam ser utilizados adicionalmente aos métodos de rastreio e, por fim, que possam ser futuros alvos terapêuticos.⁵¹

4.3. Categorias de biomarcadores em investigação para câncer de colo uterino

Para melhor compreender os complexos mecanismos da carcinogênese cervical, convencionalmente os potenciais marcadores são agrupados em diferentes grupos, de acordo com a atividade biológica de cada um deles no processo de carcinogênese. Assim, descrevem-se as seguintes áreas de investigação celular: proliferação, transcrição, adesão, invasão, angiogênese, apoptose, sinalização e inflamação.

4.3.1. Proliferação

A proliferação é um dos primeiros sinais de transformação celular, detectado precocemente no processo de carcinogênese. Entre as proteínas que regulam o ciclo celular, seis classes têm sido estudadas em cérvix normal, displásica e neoplásica: gene supressor tumoral p16 (também chamado de INK4A), Ki-67, ciclinas, inibidores de quinases dependentes de ciclina, antígeno nuclear de proliferação celular (*proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) e proteínas de manutenção minicromossômicas (*minichromosome maintenance proteins*, MCM).⁵³

P16, por exemplo, é uma proteína que 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.⁶⁷ Em lesões cervicais, a expressão de p16 é positiva na maioria das HSIL, usualmente aquelas associadas com HPV 16, mas também em alguns casos de LSIL, freqüentemente aqueles associados com HPV de alto risco. Este marcador, por exemplo, tem sido utilizado clinicamente para identificar pequenas e focais lesões intraepiteliais e ainda para distinguir casos de metaplasia imatura de NIC.⁶⁷

Nesta classe de proteínas, incluem-se também p53 e pRb, os mais bem descritos alvos da ação viral do HPV nas células humanas. HPV E7, por exemplo, inativa pRb por mutações genéticas, deleção de genes e, também, por aumento da fosforilação pela produção excessiva de quinases dependentes de ciclinas como CDK4 e CDK6. Apesar de serem detalhadamente estudados, a aplicação clínica destes reguladores de ciclo celular (p53 e pRb) é reservada, enquanto outros marcadores parecem ser mais promissores.⁵¹

PCNA também tem sido estudado como marcador de proliferação celular na carcinogênese cervical, apesar de também estar associada à proliferação de vários tecidos não-malignos. PCNA é utilizado comumente como parâmetro de comparação para estudo de novos biomarcadores, já que em casos de malignidade está bem estabelecido que ocorre aumento da expressão de PCNA à medida que o tecido neoplásico apresenta-se mais agressivo, apresentando menor expressão em lesões intraepiteliais de baixo grau e maior em casos de tumores invasores.⁶⁸⁻⁷⁹

4.3.2. Transcrição

A transcrição dos oncogenes virais E6 e E7 do HPV é um dos processos mais intensamente estudados na carcinogênese cervical, como já demonstrado anteriormente. Inúmeros estudos descrevem com detalhes a ativação e integração das proteínas E6 e

E7 ao genoma celular humano. Recentemente, proteínas como NF-kappaB (NFkB), também implicadas no processo de transcrição do material genético viral, passaram a ser também estudadas. A ativação de NFkB pela infecção pelo HPV ocasiona uma aberrante transcrição de fatores que promovem inflamação, como moléculas de adesão leucocitárias, citocinas e quimioatrativos, entre elas cita-se a COX-2.⁸⁰ Estudos iniciais comprovam que a fosforilação de NF-kappaB ocorre intensamente no citoplasma de estágios pré-malignos e que, posteriormente, quando as células assumem caráter invasor, esta proteína é degradada, manifestando-se ocasionalmente no núcleo.⁸¹

4.3.3. Adesão

As moléculas de adesão celular são glicoproteínas de membrana, as quais controlam funções celulares por meio de da ligação a outras proteínas e através da participação como citoesqueleto. As moléculas de adesão tanto podem exercer adesão entre células de mesma origem, no caso as células epiteliais, como podem ligar estroma e células. Em termos gerais, as proteínas de ligação celular são divididas em seis grupos: superfamília tipo-imunoglobulina, caderinas, integrinas, receptor de tirosina fosfatase, seletinas e receptores hialurônicos.⁵¹ A lógica na pesquisa destas proteínas está no fato de que a perda ou transformação delas pode ocasionar aumento de invasão e metástases, já que a função de adesão estará alterada. A ausência de E-caderina, por exemplo, tem sido indicada como um defeito que promove a liberação de células do sítio primário do tumor, ocasionando pior prognóstico e fenótipo mais agressivo.⁸²

Outro exemplo desta classe de biomarcadores é a integrina alfa 3 (ITGA3) que pertence à família das integrinas, um grupo de glicoproteínas responsável pela relação anatômica e funcional entre epitélio e membrana basal. Integrinas epiteliais formam receptores para macromoléculas como fibronectina, laminina e colágeno, possibilitando que a membrana

basal mantenha a arquitetura e função dos tecidos. Existem evidências que a expressão da ITGA3 esteja alterada em alguns tumores epiteliais, possivelmente em relação ao seu potencial invasor. Dois estudos abordaram ITGA3 e neoplasia de colo uterino, mostrando sua expressão diminuída em casos de malignidade.^{83,84}

Mesotelina, outra proteína deste grupo, é encontrada em abundância na superfície de células de tecidos originados do mesotélio. Apesar de sua função ser desconhecida, tem sido indicada como um biomarcador de tumores renais, mesoteliais e pancreáticos, com expressão diminuída em casos de malignidade. Seu estudo em tumores epiteliais ainda é incipiente.⁸⁵⁻⁹³

4.3.4. Invasão

Apesar de estar intimamente relacionado com adesão celular, o processo de invasão requer que a célula neoplásica, além de ser capaz de “desconectar-se” de seu sítio primário, seja hábil de ultrapassar a membrana basal, penetrar nos tecidos-alvo e degradar a matriz extracelular composta de colágeno, elastina e fibronectina. Inúmeras proteínas podem ser listadas nesta categoria, como as metaloproteinases de matriz (MMP), as quais acredita-se que exerçam um importante papel no processo de invasão tumoral. Estudos têm demonstrado a associação de MMP tipo 1 (MMP-1), tipo 2 (MMP-2 ou gelatinase) e tipo 3 (MMP-3 ou gelatinase B) com vários tipos de tumores como pulmão, cólon, fígado, mama, cérebro, ovário e inclusive câncer cervical.⁹⁴

Um recente estudo sugere que as alterações identificadas na expressão de MMP-2 não sejam dependentes diretamente da ação viral e, sim, das alterações estruturais que a célula neoplásica desenvolve. Neste mesmo estudo, comprovou-se que a razão da expressão de MMP-2 e inibidor tecidual de MMP-2, aumenta à medida que as lesões

intraepiteliais progridem, sugerindo que possam ser importantes marcadores de lesões cervicais.⁹⁵

4.3.5. Angiogênese

Angiogênese é um passo fundamental para o processo de invasão celular, podendo ser utilizada para avaliar o risco de progressão para malignidade e metastatização. Em condições normais, há um predomínio de moléculas anti-angiogências sobre pró-angiogênicas, entretanto, em condições patológicas, o equilíbrio se inverte.⁹⁶ Entre os fatores pró-angiogênicos, uma infinidade de proteínas pode ser descrita em vista de que a angiogênese pode ser estimulada por fatores que exercem também outras funções: VEGF, fator de crescimento placentário (*product placenta growth factor*, PIGF), fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*, FGF), fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF), fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF), fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF), interleucina (IL), angiogenina, fator estimulador de colônia de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*, CSF-1) e seu receptor, c-fms, entre outros.^{96,97}

VEGF corresponde a um grupo de proteínas que desempenham papel importante no crescimento e diferenciação vascular, assim como no crescimento de células endoteliais linfáticas. A neovascularização comumente encontrada em tumores malignos estaria diretamente associada à expressão aumentada desta proteína. VEGF tem sido descrito com um dos mais importantes fatores angiogênicos e sua pesquisa em câncer de colo uterino tem mostrado correlação com a gravidade das lesões. Ainda mais, a identificação do papel de VEGF e dos fatores associados ao seu estímulo é importante em patologia cervical porque, além de servir de um marcador de gravidade, inúmeras drogas estão

sendo desenvolvidas para promover o seu bloqueio, o que lhe sugere também como uma promissora opção terapêutica.⁹⁸⁻¹⁰¹

4.3.6. Apoptose

Uma das principais características das células normais é a sua eliminação por morte programada (apoptose), enquanto as células neoplásicas invariavelmente apresentam inativação deste processo. Existem inúmeros reguladores de apoptose celular, entre eles telomerase e survivin.⁵¹ Survivin, por exemplo, parece estar envolvido em passos críticos do estabelecimento de células tumorais e seu desenvolvimento. É encontrado durante a vida embrionária, mas está ausente na maioria dos tecidos diferenciados normais. Survivin apresenta expressão aumentada e está associada com um fenótipo mais agressivo, menor sobrevivência e menor resposta à quimioterapia em uma grande variedade de tecidos neoplásicos como linfoma, câncer de pulmão, cólon, pâncreas e próstata. Em relação a câncer de colo uterino, apresenta expressão aumentada à medida que o grau da lesão é mais acentuado.¹⁰²⁻¹⁰⁶

Telomerase é uma proteína ribonucléica que conserva o comprimento do telômero cromossômico. A telomerase não é ativa nas células somáticas não-malignas, mas é ativada na maioria dos cânceres humanos, provocando um aumento no tamanho dos telômeros. Partindo desta interessante observação, a telomerase ganhou importância nos últimos anos em patologia cervical, sendo que alguns estudos sugerem que até possa ser utilizada para melhorar o rastreamento citológico.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

4.3.7. Sinalização

Talvez uma das áreas mais interessantes no estudo molecular da biologia dos tumores é a sua capacidade de bloquear estímulos negativos de crescimento e promover a expressão de fatores de crescimento, não só de uma maneira autócrina, mas também pelas células dos tecidos adjacentes. Vários fatores descritos anteriormente como angiogênicos também influenciam os tumores em relação a crescimento, proliferação e invasão, como FGF, EGF, TNF, PDGF e CSF-1. Adiciona-se a eles, os fator transformador de crescimento beta (*transforming growth factor beta*, TGF- β), descrito como suprimido na presença de lesões cervicais malignas.^{110,111}

No processo de sinalização, não só proteínas são estudadas, mas também a presença de células intimamente correlacionadas à expressão desses fatores, como macrófagos e células de Langerhans. Inúmeros estudos em diferentes classes de tumores têm evidenciado que a presença de macrófagos associados a tumor (*tumor associated macrophages*, TAM) está relacionada a pior prognóstico. Os macrófagos seriam estimulados pelas células neoplásicas a migrarem para a periferia do tumor e, por meio de de “reprogramação” exercida pela sinalização tumoral, exercem uma série de funções promotoras do crescimento e invasão tumoral como degradação da matriz adjacente, angiogênese e controle imune local. Em vista desta associação entre tumor e macrófagos, recentes estudos os têm abordado como potenciais marcadores de risco e também como alvos terapêuticos, já que alcançam regiões dos tumores pouco vascularizadas que geralmente as drogas quimioterápicas não conseguem.¹¹²⁻¹¹⁵

4.3.8. Inflamação

O processo inflamatório que se segue à ativação de células displásicas e neoplásicas é capaz de influenciar todas as etapas anteriormente descritas: proliferação, transcrição, regulação do ciclo celular, adesão, invasão, angiogênese, apoptose e sinalização. Assim, o estudo de marcadores de inflamação é indispensável para a compreensão da carcinogênese cervical.¹¹⁶

COX-2 parece ser o mais promissor dos marcadores de inflamação estudados no colo uterino, também importante em adenocarcinoma colo-retal, câncer de mama, colo uterino, endométrio, ovário, próstata e pulmão. Entretanto, mais do que um biomarcador, a COX-2 é apontada como um co-fator para o processo de carcinogênese. A interação direta de prostaglandinas com seus receptores e o conseqüente aumento da sobrevivência celular e estimulação de angiogênese têm sido propostos como os mecanismos celulares responsáveis pela ação pró-carcinogênica da COX-2. Vários estudos epidemiológicos, animais e pré-clínicos demonstraram que o uso de drogas antiinflamatórias não-esteróides ou inibidores seletivos da COX-2 é fator protetor para o desenvolvimento de determinados tumores. Em termos de câncer de colo uterino, os estudos restringem-se na sua grande maioria aos casos de tumores invasores, mostrando um pior prognóstico e resistência ao tratamento dos casos que apresentam expressão aumentada de COX-2.^{61,117-125}

4.4. Uso de imunohistoquímica para pesquisa de biomarcadores cervicais

O estudo de biomarcadores usualmente inicia com a definição de eventos moleculares no processo de evolução da doença que serão alvo de investigação.⁵⁵ Até recentemente, somente grandes lesões invasoras eram possíveis de serem avaliadas pois forneciam

grande quantidade de material para ser extraído, processado e analisado molecularmente. Marcadores identificados em estágios invasores eram então testados também em lesões intraepiteliais. Biomarcadores são também sugeridos baseados no conhecimento de observações de modelos celulares *in vitro* e também baseados em observações de outras neoplasias.⁵⁵

Em vista de que os eventos moleculares que levam ao fenótipo maligno celular são mediados por proteínas, a estratégia lógica para desvendar o processo de oncogênese é estudar a presença e função destas proteínas.⁵¹ IHC é um método elegante para este objetivo que 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 imensa maioria das vezes, restritas a pequenas regiões do tecido, necessitando visão direta da morfologia celular.⁵¹

Em vista da sua flexibilidade técnica, IHC tem se mostrado indispensável para o diagnóstico diferencial de vários tumores que são rotineiramente processados em blocos de parafina. Ainda mais, IHC pode ser 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.^{51,126}

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.⁵¹

Entretanto, o uso de IHC também apresenta limitações, principalmente na interpretação dos resultados. Achados discordantes em estudos de biomarcadores freqüentemente são ocasionados pelo uso de diferentes métodos de quantificação da reação de imunohistoquímica, baseados em categorização de resultados, em grande parte dicotomizados. Isso ocasiona que resultados de estudos diferentes não possam ser efetivamente comparados entre si porque utilizaram pontos de corte diferentes.¹²⁶ Raramente evidenciamos estudos em que os valores obtidos com a quantificação da imunohistoquímica são apresentados como variáveis contínuas, o que ajudaria a promover comparações mais realísticas entre os diferentes estudos. Além disso, a variação intra e inter-observador têm sido considerada como uma importante restrição da técnica quando parâmetros claros de positividade não são apresentados.^{127,128}

O uso de escores padronizados, onde se procura quantificar a reação e não categorizá-la, e o uso de análise auxiliada por imagens digitalizadas têm promovido importante melhora da técnica.^{127,129} Contudo, a análise automatizada de imagens de imunohistoquímica está restrita a grandes centros de pesquisa, com equipamentos e softwares de alto custo, empregando complexos algoritmos que na maioria das vezes necessita um profissional especializado somente para execução da leitura das lâminas.¹³⁰⁻¹³⁴

5. JUSTIFICATIVA

Para o controle do câncer de colo uterino como um problema de saúde pública, é mandatário que o processo de carcinogênese seja mais bem compreendido. O conhecimento atual chegou até a interação entre HPV e genoma da célula hospedeira, mas a partir daí nossa compreensão é extremamente restrita.

Várias questões necessitam ser respondidas: por que algumas pacientes evoluem para câncer cervical enquanto outras não? Em que etapa do processo de transformação da cérvix uterina ocorre o desfecho maligno? Além do HPV, quais são outros co-fatores que apontam para um pior prognóstico?

Com a compreensão do processo de carcinogênese, poderemos desenvolver melhores testes prognósticos, evitar milhares de tratamentos desnecessários de lesões pré-malignas e, assim, orientarmos nossos investimentos nas pacientes que precisam atenção maior. Adicionalmente, poderemos incluir a identificação de determinados biomarcadores de risco no próprio rastreamento citológico, aumentando sensibilidade e especificidade do método. Por fim, conhecendo melhor etapas fundamentais na malignização cervical, poderemos desenvolver tratamentos específicos e efetivos, com ganho real para nossas pacientes.

Considerando que as informações na literatura são escassas e conflitantes, e que o delineamento na grande maioria das vezes não considera a progressão da doença, propomos a realização da pesquisa a seguir relatada.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo Geral

Estudar o papel de biomarcadores associados a neovascularização (VEGF, c-fms e COX-2) e inflamação (macrófagos) em lesões do colo uterino.

6.2. Objetivos Específicos

1. Propor um novo método de interpretação computadorizada de imunohistoquímica com uso de software de baixo custo e procedimentos simples;
2. Comparar este novo método de interpretação de imunohistoquímica a métodos computadorizados anteriormente descritos e à interpretação manual;
3. Estudar a expressão de VEGF, c-fms e COX-2 em estroma e epitélio escamoso de cérvix normal, LSIL, HSIL e carcinoma de células escamosas (*squamous cell carcinoma*, SCC) por imunohistoquímica;
4. Analisar a influência de c-fms e COX-2 na expressão de VEGF;
5. Avaliar a associação de VEGF, c-fms e COX-2 a HSIL, como biomarcadores de risco de progressão de NIC;

6. Descrever a distribuição de macrófagos em estroma e epitélio de cérvix normal, LSIL, HSIL e SCC com uso de anticorpo anti-CD68;
7. Descrever a intensidade da reação inflamatória estromal no processo de malignização da cérvix uterina;
8. Analisar inflamação e macrófagos como potenciais biomarcadores de risco de progressão de LSIL para HSIL.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM: Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 2003, 45 Suppl 3:S306-314
2. Waggoner SE: Cervical cancer. *Lancet* 2003, 361:2217-2225
3. Nazzer S: Meeting Report. Presented at the HPV 99 Summit. *New Approaches to the detection and elimination of cervical cancer.*, Chamonix. France., 1999 1999
4. PAHO PAHO: Cervical Cancer in Latin America and the Caribbean: Fact Sheet 2001, 2001
5. Bermudez A: Can we do the same in the developing world? *Gynecol Oncol* 2005, 99:S192-196
6. Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde do Brasil: Estimativa de incidência de câncer de colo uterino no Brasil para 2005. Webpage. URL: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326
7. Wespi HJ: 50 years colposcopy. A retrospective and a look ahead. *Ann Obstet Ginecol Med Perinat* 1988, 109:319-350
8. Papanicolaou G, Traut H: *Diagnosis of uterine cancer by vaginal smear.* New York: Commonwealth Fund 1943

9. Sankaranarayanan R, Budukh AM, Rajkumar R: Effective screening programmes for cervical cancer in low- and middle-income developing countries. *Bull World Health Organ* 2001, 79:954-962
10. Gustafsson L, Ponten J, Zack M, Adami HO: International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening. *Cancer Causes Control* 1997, 8:755-763
11. zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:342-350
12. Food and Drug Administration. FDA Licenses New Vaccine for Prevention of Cervical Cancer and Other Diseases in Females Caused by Human Papillomavirus, 2006. Webpage. URL: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01385.html>
13. Lowy DR, Schiller JT: Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 2006, 116:1167-1173
14. Lowndes CM: Vaccines for cervical cancer. *Epidemiol Infect* 2006, 134:1-12
15. Mahdavi A, Monk BJ: Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist* 2005, 10:528-538
16. Franco EL, Harper DM: Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 2005, 23:2388-2394
17. Syrjanen KJ: Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996, 65:45-53

18. Ostor AG: Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993, 12:186-192
19. Tavassoli FA DP: *Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. World Health Organization Classification of Tumours 2003. Lyon, IARC Press, WHO, 2003
20. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Jr., Young N: The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama* 2002, 287:2114-2119
21. Franco EL, Schlecht NF, Saslow D: The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J* 2003, 9:348-359
22. Syrjänen K, Naud P, Derchain S, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, Tatti S, Branca M, Eržen M, Hammes LS, Matos J, Gontijo R, Sarian L, Bragança J, Arlindo FC, Maeda MYS, Lörincz A, Dores GB, Costa S, Syrjänen S: Comparing Pap Smear Cytology, Aided Visual Inspection, Screening Colposcopy, Cervicography and HPV Testing as Optional Screening Tools in Latin America. Study Design and Baseline Data of The Lams Study*. *Gynecol Onc* 2005
23. Sankaranarayanan R, Basu P, Wesley RS, Mahe C, Keita N, Mbalawa CC, Sharma R, Dolo A, Shastri SS, Nacoulma M, Nayama M, Somanathan T, Lucas E, Muwonge R, Frappart L, Parkin DM: Accuracy of visual screening for cervical neoplasia: Results from an IARC multicentre study in India and Africa. *Int J Cancer* 2004, 110:907-913

24. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP: Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998, 92:727-735
25. Naud P, Hammes L, Matos J, Magno V, Galão A, Vanin C, Pedrini R, Syrjanen KJ: Eurogin - 6th International Multidisciplinary Congress. Paris, European Research Organization on Genital Infection and Neoplasia, 2006, pp 105
26. Nuovo J, Melnikow J, Willan AR, Chan BK: Treatment outcomes for squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 2000, 68:25-33
27. Cox JT: Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1995, 9:1-37
28. Katase K, Teshima H, Hirai Y, Hasumi K: Natural history of cervical human papillomavirus lesions. *Intervirology* 1995, 38:192-194
29. Furber SE, Weisberg E, Simpson JM: Progression and regression of low-grade epithelial abnormalities of the cervix. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1997, 37:107-112
30. Duggan MA, McGregor SE, Stuart GC, Morris S, Chang-Poon V, Schepansky A, Honore L: The natural history of CIN I lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998, 19:338-344
31. Konno R, Paez C, Sato S, Yajima A, Fukao A: HPV, histologic grade and age. Risk factors for the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Reprod Med* 1998, 43:561-566

32. Paraskevaïdis E, Kalantaridou SN, Georgiou I, Koliopoulos G, Pappa L, Malamou-Mitsi V, Agnantis NJ, Kitchener HC, Lolis DE: Spontaneous evolution of human papillomavirus infection in the uterine cervix. *Anticancer Res* 1999, 19:3473-3478
33. Duggan MA: A review of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002, 29 Suppl 1:176-193
34. Yokoyama M, Iwasaka T, Nagata C, Nozawa S, Sekiya S, Hirai Y, Kanazawa K, Sato S, Hoshiai H, Sugase M, Kawana T, Yoshikawa H: Prognostic factors associated with the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a cohort study in Japan. *Cancer Lett* 2003, 192:171-179
35. ACOG ACoOaG: Cervical Cancer Screening: Testing Can Start Later and Occur Less Often Under New ACOG Recommendations, American College of Obstetricians and Gynecologists ACOG, 2003
36. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ: American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006, 56:11-25
37. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ: 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *Jama* 2002, 287:2120-2129
38. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87:796-802

39. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999, 189:12-19
40. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S: Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003, 88:63-73
41. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ: Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003, 348:518-527
42. Hebner CM, Laimins LA: Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 2006, 16:83-97
43. Zheng ZM, Baker CC: Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006, 11:2286-2302
44. Longworth MS, Laimins LA: Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, 68:362-372
45. Kim SH, Juhn YS, Kang S, Park SW, Sung MW, Bang YJ, Song YS: Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/Akt. *Cell Mol Life Sci* 2006, 63:930-938
46. Doorbar J: Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006, 110:525-541

47. Mathur RS, Mathur SP: Vascular endothelial growth factor (VEGF) up-regulates epidermal growth factor receptor (EGF-R) in cervical cancer in vitro: this action is mediated through HPV-E6 in HPV-positive cancers. *Gynecol Oncol* 2005, 97:206-213
48. Borbely AA, Murvai M, Konya J, Beck Z, Gergely L, Li F, Veress G: Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol* 2006, 87:287-294
49. Munger K, Yee CL, Phelps WC, Pietenpol JA, Moses HL, Howley PM: Biochemical and biological differences between E7 oncoproteins of the high- and low-risk human papillomavirus types are determined by amino-terminal sequences. *J Virol* 1991, 65:3943-3948
50. Toussaint-Smith E, Donner DB, Roman A: Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. *Oncogene* 2004, 23:2988-2995
51. Syrjanen KJ: Immunohistochemistry in assessment of molecular pathogenesis of cervical carcinogenesis. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005, 26:5-19
52. Baak JP, Kruse AJ, Janssen E, van Diermen B: Predictive testing of early CIN behaviour by molecular biomarkers. *Cell Oncol* 2005, 27:277-280
53. Padilla-Paz LA: Emerging technology in cervical cancer screening: status of molecular markers. *Clin Obstet Gynecol* 2005, 48:218-225
54. Gray LJ, Herrington CS: Molecular markers for the prediction of progression of CIN lesions. *Int J Gynecol Pathol* 2004, 23:95-96

55. Unger ER, Steinau M, Rajeevan MS, Swan D, Lee DR, Vernon SD: Molecular markers for early detection of cervical neoplasia. *Dis Markers* 2004, 20:103-116
56. Chatterjee SK, Zetter BR: Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol* 2005, 1:37-50
57. Bast RC, Jr., Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshin A, Menon U, Jacobs I, Lu K: New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer* 2005, 15 Suppl 3:274-281
58. Milas L: Cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme inhibitors and radiotherapy: preclinical basis. *Am J Clin Oncol* 2003, 26:S66-69
59. Choy H, Milas L: Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? *J Natl Cancer Inst* 2003, 95:1440-1452
60. Davis TW, Hunter N, Trifan OC, Milas L, Masferrer JL: COX-2 inhibitors as radiosensitizing agents for cancer therapy. *Am J Clin Oncol* 2003, 26:S58-61
61. Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, Lauriola L, Salutari V, Gessi M, Testa AC, Werner U, Navarra P, Tringali G, Battaglia A, Scambia G: Celecoxib modulates the expression of cyclooxygenase-2, ki67, apoptosis-related marker, and microvessel density in human cervical cancer: a pilot study. *Clin Cancer Res* 2003, 9:4324-4331
62. Kim SH, Song SH, Kim SG, Chun KS, Lim SY, Na HK, Kim JW, Surh YJ, Bang YJ, Song YS: Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004, 130:551-560

63. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE: The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002, 196:254-265
64. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW: Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001, 193:727-740
65. Kruse AJ, Baak JP, Janssen EA, Kjellevold KH, Fiane B, Lovslett K, Bergh J, Robboy S: Ki67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cell Oncol* 2004, 26:13-20
66. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P: Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995, 141:680-689
67. O'Neill CJ, McCluggage WG: p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2006, 13:8-15
68. Wistuba I, Roa I, Araya JC, Villaseca M, Capurro I, Chavez F: [Proliferating cell nuclear antigen in cervical cancer and precursor lesions]. *Rev Med Chil* 1995, 123:1077-1083
69. Busmanis I: Biomarkers in carcinoma of the cervix: emphasis on tissue-related factors and their potential prognostic factors. *Ann Acad Med Singapore* 1998, 27:671-675
70. Fujiwaki R, Hata K, Iida K, Maede Y, Miyazaki K: Vascular endothelial growth factor expression in progression of cervical cancer: correlation with thymidine phosphorylase expression, angiogenesis, tumor cell proliferation, and apoptosis. *Anticancer Res* 2000, 20:1317-1322

71. Heatley MK: What is the value of proliferation markers in the normal and neoplastic cervix? *Histol Histopathol* 1998, 13:249-254
72. Herbsleb M, Knudsen UB, Orntoft TF, Bichel P, Norrild B, Knudsen A, Mogensen O: Telomerase activity, MIB-1, PCNA, HPV 16 and p53 as diagnostic markers for cervical intraepithelial neoplasia. *Apmis* 2001, 109:607-617
73. Huang Y, Cai S, Yu S: [Significance of c-erbB-2 and PCNA expression in adenocarcinoma of uterine cervix]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1997, 19:150-152
74. Mathevet P, Frappart L, Hittelman W: [Cervix dysplasias: study of Rb and p53 gene expression and correlation with mitotic activity]. *Gynecol Obstet Fertil* 2000, 28:44-50
75. Oka K, Nakano T, Hoshi T: Analysis of response to radiation therapy of patients with cervical adenocarcinoma compared with squamous cell carcinoma. MIB-1 and PC10 labeling indices. *Cancer* 1996, 77:2280-2285
76. Smela M, Chosia M, Domagala W: Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) expression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN). An immunohistochemical study. *Pol J Pathol* 1996, 47:171-174
77. Soini Y, Pollanen R, Kemppainen S, Paakko P, Lehto VP: The association of vascular proliferation with HPV status and epithelial PCNA positivity in cervical intraepithelial lesions. *Apmis* 1996, 104:183-190
78. Tjalma W, Weyler J, Pollefliet C, Bogers J, Van Marck E, van Dam P, Buytaert P: The evaluation of proliferative activity in CIN III and microinvasive cervical cancer and its role in recurrence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001, 94:270-275

79. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL: Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10:2407-2414
80. Nair S, Pillai MR: Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis* 2005, 11:350-359
81. Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, Nair B, Karunagaran D: NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene* 2003, 22:50-58
82. Kaplanis K, Kiziridou A, Liberis V, Destouni C, Galazios G: E-cadherin expression during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005, 26:608-610
83. Hughes DE, Rebello G, al-Nafussi A: Integrin expression in squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* 1994, 173:97-104
84. Valea FA, Haskill S, Moore DH, Fowler WC, Jr.: Immunohistochemical analysis of alpha 1-integrins in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1995, 173:808-813
85. Cao D, Ji H, Ronnett BM: Expression of mesothelin, fascin, and prostate stem cell antigen in primary ovarian mucinous tumors and their utility in differentiating primary ovarian mucinous tumors from metastatic pancreatic mucinous carcinomas in the ovary. *Int J Gynecol Pathol* 2005, 24:67-72
86. Drapkin R, Crum CP, Hecht JL: Expression of candidate tumor markers in ovarian carcinoma and benign ovary: evidence for a link between epithelial phenotype and neoplasia. *Hum Pathol* 2004, 35:1014-1021

87. McCarthy DM, Maitra A, Argani P, Rader AE, Faigel DO, Van Heek NT, Hruban RH, Wilentz RE: Novel markers of pancreatic adenocarcinoma in fine-needle aspiration: mesothelin and prostate stem cell antigen labeling increases accuracy in cytologically borderline cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003, 11:238-243
88. Muminova ZE, Strong TV, Shaw DR: Characterization of human mesothelin transcripts in ovarian and pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2004, 4:19
89. Ordonez NG: Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2003, 27:1418-1428
90. Ordonez NG: Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Mod Pathol* 2003, 16:192-197
91. Ordonez NG: The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between mesothelioma and renal cell carcinoma: a comparative study. *Hum Pathol* 2004, 35:697-710
92. Pan CC, Chen PC, Chou TY, Chiang H: Expression of calretinin and other mesothelioma-related markers in thymic carcinoma and thymoma. *Hum Pathol* 2003, 34:1155-1162
93. Swierczynski SL, Maitra A, Abraham SC, Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Cameron JL, Schulick RD, Yeo CJ, Rahman A, Hinkle DA, Hruban RH, Argani P: Analysis of novel tumor markers in pancreatic and biliary carcinomas using tissue microarrays. *Hum Pathol* 2004, 35:357-366

94. Zhai Y, Hotary KB, Nan B, Bosch FX, Munoz N, Weiss SJ, Cho KR: Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. *Cancer Res* 2005, 65:6543-6550
95. Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Syrjanen S, Favalli C, Syrjanen K: Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. *Anticancer Res* 2006, 26:1543-1556
96. Graca B, Lunet C, Coelho AS, Monteiro G, Freire P, Speidel A, Carvalho L: [Angiogenesis and cancer: from biopathology to therapy]. *Acta Med Port* 2004, 17:76-93
97. Gasparini G, Longo R, Toi M, Ferrara N: Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nat Clin Pract Oncol* 2005, 2:562-577
98. Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, Matsui H, Seki K, Sekiya S: Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 2005, 103:724-730
99. Fujimoto J, Toyoki H, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T: Clinical implication of expression of vascular endothelial growth factor-C in metastatic lymph nodes of uterine cervical cancers. *Br J Cancer* 2004, 91:466-469
100. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, Hammond E, Seaman J, Holden J, Lee RJ, Zempolich K, Dodson M: Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular

- endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, 56:922-928
101. Kodama J, Seki N, Tokumo K, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M, Okuda H, Kudo T: Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999, 35:485-489
 102. Frost M, Jarboe EA, Orlicky D, Gianani R, Thompson LC, Enomoto T, Shroyer KR: Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2002, 117:738-744
 103. Kim HS, Shiraki K, Park SH: Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Anticancer Res* 2002, 22:805-808
 104. Lee JP, Chang KH, Han JH, Ryu HS: Survivin, a novel anti-apoptosis inhibitor, expression in uterine cervical cancer and relationship with prognostic factors. *Int J Gynecol Cancer* 2005, 15:113-119
 105. Rein DT, Breidenbach M, Nettelbeck DM, Kawakami Y, Siegal GP, Huh WK, Wang M, Hemminki A, Bauerschmitz GJ, Yamamoto M, Adachi Y, Takayama K, Dall P, Curiel DT: Evaluation of tissue-specific promoters in carcinomas of the cervix uteri. *J Gene Med* 2004, 6:1281-1289
 106. Smith SD, Wheeler MA, Plescia J, Colberg JW, Weiss RM, Altieri DC: Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *Jama* 2001, 285:324-328
 107. Sen S, Reddy VG, Guleria R, Jain SK, Kapila K, Singh N: Telomerase--a potential molecular marker of lung and cervical cancer. *Clin Chem Lab Med* 2002, 40:994-1001

108. Ault KA, Allen HK, Phillips SL, Zimmerman MB, Klingelutz AJ: Telomerase activity as a potential diagnostic marker for triage of abnormal Pap smears. *J Low Genit Tract Dis* 2005, 9:93-99
109. Kyo S, Takakura M, Ishikawa H, Sasagawa T, Satake S, Tateno M, Inoue M: Application of telomerase assay for the screening of cervical lesions. *Cancer Res* 1997, 57:1863-1867
110. 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* 2002, 33:1193-1199
111. 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* 2000, 192:494-501
112. Zijlmans HJ, Fleuren GJ, Baelde HJ, Eilers PH, Kenter GG, Gorter A: The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2. *J Pathol* 2006, 208:507-517
113. Nagy T, Glavinas H, Szincsak N, Hunyadi J, Janossy T, Duda E, Vizler C, Juhasz I: Tumor cells expressing membrane-bound tumor necrosis factor activate macrophages and have a compromised growth in immunosuppressed and immunodeficient mice. *Cancer Lett* 2003, 196:49-56
114. Heller DS, Hameed M, Cracchiolo B, Wiederkehr M, Scott D, Skurnick J, Ammar N, Lambert WC: Presence and quantification of macrophages in squamous cell carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2003, 13:67-70

115. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D: Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002, 161:947-956
116. Muller R: Crosstalk of oncogenic and prostanoid signaling pathways. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004, 130:429-444
117. Kim YB, Kim GE, Pyo HR, Cho NH, Keum KC, Lee CG, Seong J, Suh CO, Park TK: Differential cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004, 60:822-829
118. Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, Gessi M, Salutari V, Distefano MG, Lauriola L, Zannoni GF, Martinelli E, Scambia G: Prognostic role of the ratio between cyclooxygenase-2 in tumor and stroma compartments in cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10:3117-3123
119. Landen CN, Jr., Mathur SP, Richardson MS, Creasman WT: Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. *Am J Obstet Gynecol* 2003, 188:1174-1176
120. Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ: Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003, 37:28-33
121. Kim HJ, Wu HG, Park IA, Ha SW: High cyclooxygenase-2 expression is related with distant metastasis in cervical cancer treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, 55:16-20

122. Kim YB, Kim GE, Cho NH, Pyo HR, Shim SJ, Chang SK, Park HC, Suh CO, Park TK, Kim BS: Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer* 2002, 95:531-539
123. Gaffney DK, Holden J, Davis M, Zempolich K, Murphy KJ, Dodson M: Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, 49:1213-1217
124. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001, 7:429-434
125. Farley J, Uyehara C, Hashiro G, Belnap C, Birrer M, Salminen E: Cyclooxygenase-2 expression predicts recurrence of cervical dysplasia following loop electrosurgical excision procedure. *Gynecol Oncol* 2004, 92:596-602
126. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H: Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol* 2001, 25:1204-1207
127. Leong AS: Pitfalls in diagnostic immunohistology. *Adv Anat Pathol* 2004, 11:86-93
128. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Ruschoff J, Tomasic G, van de Vijver M: Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003, 16:173-182
129. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M: A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1995, 48:876-878

130. Atkin G, Barber PR, Vojnovic B, Daley FM, Glynn-Jones R, Wilson GD: Correlation of spectral imaging and visual grading for the quantification of thymidylate synthase protein expression in rectal cancer. *Hum Pathol* 2005, 36:1302-1308
131. Ruifrok AC, Katz RL, Johnston DA: Comparison of quantification of histochemical staining by hue-saturation-intensity (HSI) transformation and color-deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003, 11:85-91
132. Hatanaka Y, Hashizume K, Nitta K, Kato T, Itoh I, Tani Y: Cytometrical image analysis for immunohistochemical hormone receptor status in breast carcinomas. *Pathol Int* 2003, 53:693-699
133. Barshack I, Kopolovic J, Malik Z, Rothmann C: Spectral morphometric characterization of breast carcinoma cells. *Br J Cancer* 1999, 79:1613-1619
134. Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick CW, Jr.: Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J Histochem Cytochem* 2003, 51:575-584

8. ARTIGO CIENTÍFICO 1

8.1. Versão em português

**ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA BIOMARCADOR
DE CÂNCER CERVICAL ATRAVÉS DE SOFTWARE SIMPLES E DE BAIXO CUSTO**

Luciano S. Hammes^{1 2}, Jeffrey E. Korte³, Rajeshwar Rao Tekmal², Paulo Naud¹, Maria Isabel Edelweiss⁴, Philip T. Valente⁵, Adhemar Longatto-Filho⁶, Nameer Kirma², João Sabino Cunha-Filho¹.

¹ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade to Texas em San Antonio, San Antonio, Texas, Estados Unidos

³ Departamento de Bioestatística, Bioinformática e Epidemiologia, Universidade Médica da Carolina do Sul, Charleston, Carolina do Sul, Estados Unidos

⁴ Departamento de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

⁵ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade to Texas em San Antonio, San Antonio, Texas, Estados Unidos

⁶ Instituto de Pesquisa de Ciências da Vida e Saúde, Escola de Ciências Médicas,
Universidade do Minho, Braga, Portugal

Correspondências e solicitação de cópias: Dr. Luciano S. Hammes, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade to Texas em San Antonio, San Antonio, Texas, Estados Unidos. End: 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, TX 78229-3900, USA. Telefone: +1. 210.567.4930. Fax: +1.210.567.4958. Email: hammes@cpovo.net.

Palavras-chave: análise de imagem; auxílio de computador; imunohistoquímica; biomarcador de câncer de colo uterino.

Título resumido: Análise computadorizada de imunohistoquímica

Agradecimentos: este trabalho foi apoiado pelo contrato 0629/05-7 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, e pelo contrato 05-154 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Fundo de Incentivo à Pesquisa (HCPA-FIPE), Brasi. Agradecemos Sr. Gregory A. Langone, Sra. Joanne Click e Srta. Renata Pedrini pela ajuda técnica. Também somos gratos à Prof^a. Nadine Clausell Ph.D. e Sra. Indara Carmin pelo apoio a este estudo.

RESUMO

O estudo de biomarcadores para câncer de colo uterino e lesões intraepiteliais cervicais por imunohistoquímica (IHC) é um campo promissor. Entretanto, a interpretação manual de IHC e reprodutibilidade dos escores aplicados podem ser altamente subjetivos.

Neste artigo, apresentamos um simples e novo método de interpretação computadorizada de IHC baseado no padrão de cores ciano-magenta-amarelo-preto (*cyan-magenta-yellow-black*, CMYK) para tecidos corados com diaminobenzidina (DAB) e contracorados com verde de metila.

Um total de 67 imagens microscópicas de câncer de colo uterino, cérvix normal e controles negativos foram analisadas com o software Corel Photo Paint X3 tanto no padrão de cores CMYK, quanto no padrão de cores vermelho-verde-azul (*red-green-blue*, RGB), e comparadas à interpretação manual de lâminas de IHC baseada no escore-H. A correlação mais aproximada e positiva com o escore-H foi obtida utilizando os valores brutos do canal de cor magenta do padrão CMYK (correlação de Spearman = 0,84; concordância de 93.33%, $P < 0.001$). Para obter este valor, somente três passos foram necessários: converter a imagem para padrão CMYK, selecionar a área de interesse e abrir a ferramenta de histograma para visualizar o valor de magenta.

Este novo método é mais fácil de ser realizado que métodos previamente descritos baseados no padrão de cores RGB e apresenta uma forte correlação com interpretação manual. O método apresentado é simples, objetivo e requer somente o uso de software de baixo custo e mínimo conhecimento de informática.

INTRODUÇÃO

A imunohistoquímica (IHC) tem sido utilizada para analisar, descrever e comparar os efeitos de diversas proteínas envolvidas em doenças malignas. No câncer cervical, e especialmente nas lesões intraepiteliais cervicais, onde as células alteradas costumam ser restritas a determinadas regiões, este método permite a visualização das proteínas em regiões específicas. As técnicas que analisam o ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*, DNA) / ácido ribonucléico (*ribonucleic acid*, RNA) podem objetivamente detectar a quantidade e atividade da proteína em uma amostra, entretanto elas podem não refletir adequadamente a disposição das proteínas no tecido. Por outro lado, a IHC é capaz de demonstrar *in situ* a localização das proteínas e ainda quantificá-las indiretamente.^{1,2} A IHC tem sido utilizada para o estudo de vários tumores ginecológicos como os mamários, ováricos e endometriais. Em câncer de mama, por exemplo, IHC é rotineiramente utilizada para quantificação de receptores de estrogênio e progesterona e, mais recentemente, para o proto-oncogene HER2/neu.^{3,4}

Entretanto, a interpretação manual de IHC pode ser altamente subjetiva, necessitando o desenvolvimento de métodos de leitura mais confiáveis e quantitativos. Vários patologistas expressam os resultados de IHC baseados na impressão do número de células positivas, utilizando pontos de corte arbitrários que podem variar de 5 a 50%, com a intensidade da reação tendo pouco ou nenhuma importância. Entretanto, outros escores manuais, como o escore-H e o escore-Q, não se baseiam somente na quantidade das células coradas, mas também na intensidade.⁵⁻⁷ Independentemente do escore utilizado, a maioria deles é laborosa e altamente sujeita à variabilidade intra e interobservador.^{8,9}

Vários métodos de interpretação de IHC por análise computadorizada de imagens têm sido comprovados como superiores à interpretação manual, diminuindo a variação das leituras e proporcionando uma quantificação objetiva, acurada e detalhada das reações.¹⁰⁻¹⁶ Entretanto, vários destes métodos que utilizam auxílio do computador requerem procedimentos complexos e softwares de alto custo, os quais não estão disponíveis em muitos laboratórios e centros de pesquisa.^{14,17,18}

Outras técnicas de leitura computadorizada mais simples e baseiam-se em software de baixo custo desenvolvidos originalmente para artes gráficas (por exemplo, Adobe Photoshop) e simples passos para a interpretação da IHC. Estes estudos utilizam o padrão de cores vermelho-verde-azul (*red-green-blue*, RGB) como cores primárias, o qual é também amplamente utilizado em câmeras digitais e telas de computadores. A maioria dos estudos com RGB é baseado em procedimentos de IHC que utilizam diaminobenzidina (DAB) como corante para o núcleo e hematoxilina como contracoloração.^{4,11,12,16,19-24}

Entre todos os estudos baseados em técnicas simples com uso de computador, nenhum utilizou o software Corel Photo Paint, também de baixo custo e desenvolvido para artes gráficas. Também não há referência a outro tipo de coloração utilizada freqüentemente em IHC: DAB citoplasmático e contracoloração com verde de metila. Ainda mais, o sistema de cores ciano-magenta-amarelo-preto (*cyan-magenta-yellow-black*, CMYK), freqüentemente utilizado em artes gráficas e impressões, nunca foi descrito em estudos de análise digital de IHC. Este sistema de cores é relacionado ao RGB, mas, ao contrário de utilizar vermelho, verde e azul como cores primárias, utiliza ciano, magenta, amarelo e preto. Por fim, nenhum dos estudos faz referência à análise de IHC em neoplasia cervical.

O objetivo deste estudo é apresentar e validar uma técnica simples e acurada para análise digital de imunohistoquímica, realizada com DAB corando citoplasma e verde de

metila como contracoloração, utilizando o software Corel Photo Paint e o sistema de cores CMYK, comparando-a ao sistema de cores RGB e à interpretação manual com escore-H.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento e material

Foi realizado um estudo transversal com blocos de parafina de biópsias cervicais realizadas no período de 2000 a 2003, obtidos do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. As biópsias foram realizadas rotineiramente como parte do rastreamento de câncer de colo uterino do hospital, com as amostras fixadas em formaldeído e embebidas em parafina. Aprovação do Comitê de Ética local foi obtida antes de qualquer procedimento.

Imunohistoquímica

As amostras cervicais foram seccionadas com espessura de 4 μ m, sendo o primeiro corte corado com hematoxilina e eosina (H&E), com objetivo de revisão de diagnóstico patológico, e o seguinte corado por IHC para ciclooxigenase-2 (COX-2).

Para proceder-se à IHC, as lâminas foram secadas em 60°C por 20 minutos, desparafinizadas em xilol, reidratadas através de vários gradientes de álcool e finalmente lavadas com água destilada. Recuperação dos epítomos foi obtida fervendo-se as lâminas em solução tampão de citrato, pH6.0, por 20 minutos e esfriando-as por mais 20 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram dispostas em bandejas semi-automáticas para realização de IHC (Sequenza, Thermo Electron Corporation; Waltham, MA, EUA).

A IHC foi realizada com a reação do complexo de avidina-biotina (ABC), utilizando reagentes LV's Ultravision (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), em temperatura ambiente, de acordo com as orientações do fabricante. Bloqueador do Peróxido de Hidrogênio foi aplicado por 12 minutos, seguido por Bloqueador Ultra-V por 5 minutos para bloquear biotina. As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário, originário de coelho, monoclonal, anti-COX-2 humano (Clone SP21; Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), diluído em 1:150, por 30 minutos. A escolha do anticorpo COX-2 foi devido ao fato de que previamente identificamos que apresenta afinidade citoplasmática específica e porque apresenta marcada diferença entre cérvix normal e carcinoma cervical, características de um biomarcador candidato à investigação.

Posteriormente, anticorpo secundário ligado à biotina foi aplicado por 30 minutos, sendo seguido por estreptavidina-peroxidase por 10 minutos. A reação então foi revelada com a aplicação do cromógeno DAB por 5 minutos. Como passo final, as lâminas foram coradas com o contraste verde de metila por 5 minutos, lavadas em água destilada, desidratadas em gradientes de álcool e protegidas com lamínula. Controles negativos foram obtidos omitindo-se o anticorpo primário. Carcinoma de mama foi utilizado como controle positivo externo e células glandulares cervicais como controle positivo interno.

Obtenção das imagens

Para cada caso, três regiões representativas foram previamente escolhidas nas lâminas de H&E por um patologista cegado. Estas regiões foram, então, fotografadas nas lâminas de IHC utilizando-se microscópio com câmera digital Nikon DXM 1200F, com software

Nikon ACT1 versão 2.63, equalização de branco, 300 unidades arbitrárias (UA) de brilho (considerado a iluminação padrão do microscópio) e aumento de 200 vezes (Nikon; Melville, NY, EUA).

As imagens foram gravadas originalmente em sistema de cores RGB, formato de compressão JPEG (Joint Photographic Experts Group) em arquivos pequenos (\pm 500KB; 1.280 x 1.024 pixels). Brilho e balanço de cores foram ajustados inicialmente de acordo com a imagem real visualizada pelas lentes do microscópio e foram mantidos exatamente os mesmos durante todo o processo de aquisição de imagens.

Para análise adicional, foi também obtido um grupo de imagens em alta resolução (\pm 5000KB; 3.840 x 3.072 pixels) e um grupo com diferentes ajustes de luz. Todas as imagens do estudo foram gravadas e processadas em um computador, baseado no sistema Windows, processador 2.00GHz, memória RAM de 512MB.

Avaliação manual e computadorizada

Cada imagem em tamanho pequeno de arquivo foi analisada por dois patologistas utilizando o escore-H.⁷ O percentual de células em cada categoria de coloração citoplasmática (negativo, fraco, moderado ou forte) foi contado e o escore-H obtido com a seguinte fórmula:

Escore-H = (% células sem coloração x 0) + (% células fracamente coradas x 1) + (% células moderadamente coradas x 2) + (% células fortemente coradas x 3)

Por conseguinte, o escore-H variou entre 0 (100% de células negativas) e 300 (100% de células fortemente coradas), sendo que o escore final para cada caso foi uma média das

três diferentes áreas avaliadas e uma média da avaliação dos patologistas. Valores maiores ou iguais a 50 foram considerados positivos.

A mesma imagem analisada utilizando o escore-H foi também submetida à análise computadorizada, primeiramente utilizando o sistema de cores RGB e posteriormente utilizando o padrão CMYK. Imagens em RGB foram abertas no programa Corel Photo Paint X3 (Corel Corporation; Eden Prairie, MN) e as áreas de interesse, câncer ou epitélio normal, foram selecionadas utilizando o comando “Máscara de Mão-Livre”. Este comando permite ao usuário excluir áreas da análise que não sejam de interesse como estroma e tecido glandular. Após, o comando “Histograma” foi selecionado na barra de ferramentas “Imagem”, mostrando os valores dos canais de cores vermelho, verde e azul. Numa breve descrição, histograma de cores é uma ferramenta que mostra a quantidade de cada cor em determinada imagem.

Posteriormente, a imagem foi convertida para o padrão CMYK e o mesmo procedimento com o uso de histograma foi realizado, identificando-se os valores de ciano, magenta e amarelo (figura 1). Os valores de preto não são apresentados pelo software em vista das imagens serem capturadas inicialmente em sistema RGB, o qual não apresenta preto. Similarmente ao escore-H, os valores finais de RGB e CMYK para cada caso foi uma média das aferições em suas diferentes áreas.

A partir dos valores de cores obtidos, possíveis escores foram criados combinando as cores entre si ou utilizando valores brutos com o objetivo de quantificar a expressão de DAB e compará-los ao escore-H. Com os valores do sistema de cores RGB, oito possíveis escores foram calculados, alguns de acordo com estudos previamente publicados²⁵⁻²⁹: 1) valor de vermelho; 2) valor de azul; 3) valor de verde; 4) vermelho + azul; 5) verde/azul; 6) 255-vermelho 7) azul – (0.3*(vermelho + verde)); 8) (255*azul)/(vermelho + verde + azul). Para o sistema de cores CMYK, seis diferentes possíveis escores foram testados: 9) valor de ciano; 10) valor de magenta; 11) valor de

amarelo; 12) magenta + amarelo; 13) $(\text{magenta/ciano}) \cdot 100$; 14) $(\text{magenta} \cdot 100) / (\text{magenta} + \text{amarelo})$.

Análise Estatística

A correlação entre os possíveis escores em estudo e o escore-H foram avaliados baseados no Coeficiente de Correlação de Spearman (r). Variáveis com distribuição normal foram comparadas com uso do Teste t de Student, utilizando média \pm desvio-padrão (DP), enquanto comparação de variáveis com distribuição anormal foram analisadas utilizando-se o Teste de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis. A concordância entre resultados foi avaliada em tabelas de contigência por Teste Exato de Fisher. Os valores apresentados neste estudo são em unidades arbitrárias. Valores de P abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Um total de 26 imagens de 10 carcinomas de células escamosas (*squamous cells carcinoma*, SCC) e 26 imagens de 10 cérvices normais foi selecionado para o estudo. Alguns casos foram analisados em menos de 3 regiões por serem pequenos. Adicionalmente, 15 imagens de controles negativos (5 casos de câncer e 5 casos de cérvice normal) foram selecionados. Ao total, 67 imagens foram incluídas para análise.

A expressão de COX-2 foi predominantemente citoplasmática, específica para células epiteliais, com poucas células inflamatórias expressando a proteína. Com o uso do escore-H, 92,3% das imagens de câncer e 15,4% das imagens de cérvice normal foram consideradas positivas para COX-2. Os valores do escore-H (média \pm desvio padrão) para câncer, epitélio normal e controles negativos foram $158,65 \pm 71,85$, $17,88 \pm 26,23$ e 0 ± 0 , respectivamente (Kruskal-Wallis, $P < 0,001$).

Com os valores de cores obtidos pelo histograma de imagens em RGB e CMYK criou-se diferentes escores que foram comparados ao manual escore-H. De todos os escores testados, o escore que mais se aproximou da avaliação manual foi o obtido com os valores brutos do canal de cor magenta do sistema CMYK (que chamaremos de escore-magenta), com Coeficiente de Correlação de Spearman de 0,84 (tabela 1). Um exemplo de interpretação da imunohistoquímica com os valores de cor magenta está apresentado na figura 1.

**Tabela 1. Coeficiente de correlação de escores baseados em análise digital e
escore-H**

Escore baseado em cores - análise digital			Coeficiente de correlação de Spearman	<i>P</i>
Formato de cores em RGB	Escore 1	Valor de vermelho	- 0,58	< 0,001
	Escore 2	Valor de azul	- 0,72	< 0,001
	Escore 3	Valor de verde	- 0,76	< 0,001
	Escore 4	Vermelho + Azul	- 0,68	< 0,001
	Escore 5	Verde / Azul	0,77	< 0,001
	Escore 6	255 – vermelho	0,58	< 0,001
	Escore 7	Azul – (0,3 * (Vermelho + Verde))	-0,82	< 0,001
	Escore 8	(255 * Azul) / (Vermelho + Verde + Azul)	-0,84	< 0,001
Formato de cores em CMYK	Escore 9	Ciano	0,57	< 0,001
	Escore 10	Magenta	0,84	< 0,001
	Escore 11	Amarelo	0,76	< 0,001
	Escore 12	Magenta + Amarelo	0,79	< 0,001
	Escore 13	(Magenta / Ciano) * 100	0,40	< 0,001
	Escore 14	(Magenta*100) / (Magenta+Amarelo)	0,04	0,6789

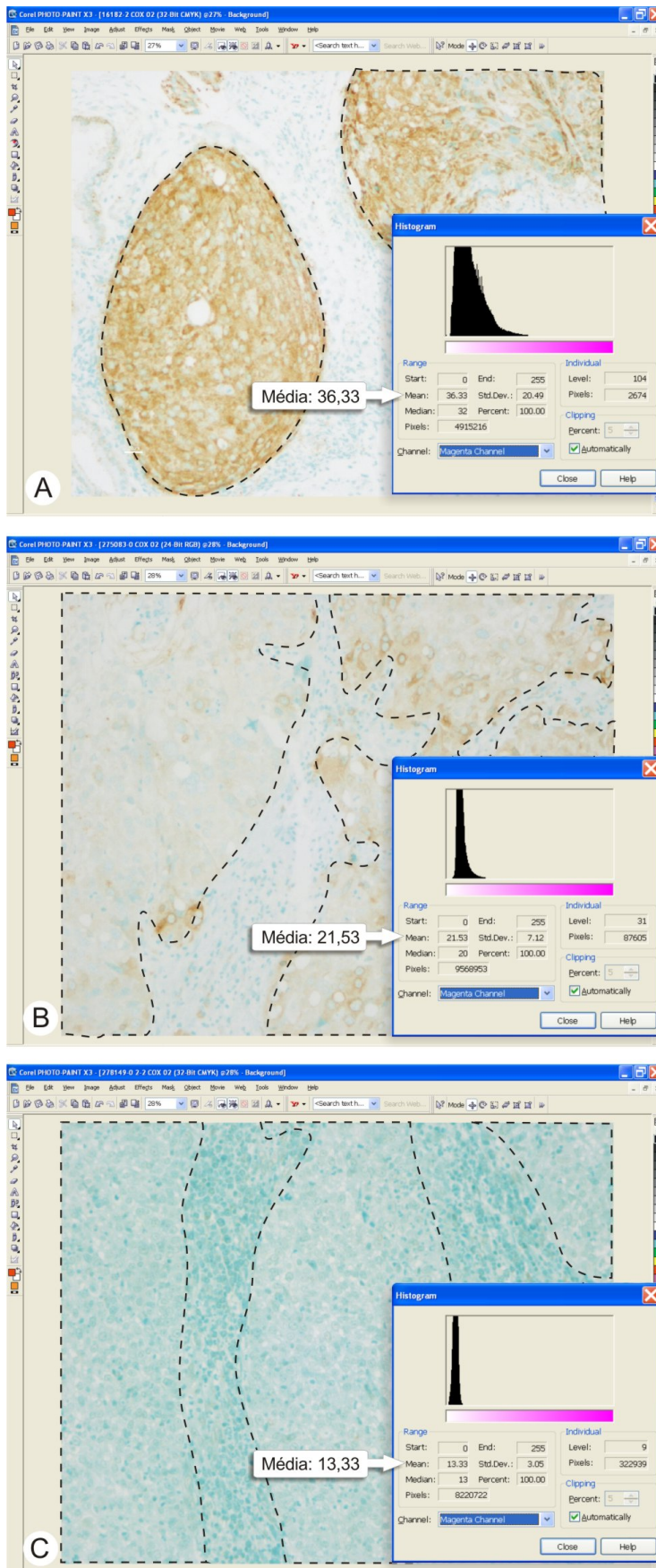


Figura 1. Histograma de amostras de carcinoma cervical de células escamosas mostrando (A) forte, (B) moderada e (C) negativa expressão de COX-2 por IHC. As imagens foram convertidas previamente para o padrão de cores CMYK, as áreas a serem analisadas foram selecionadas e, então, a ferramenta histograma foi acessada, sendo o canal de cor magenta selecionado. Note que os valores de magenta são equivalentes à intensidade da coloração por IHC.

Como o escore-H, o escore-magenta foi estatisticamente diferente entre os casos normais, cânceres e controles negativos (tabela 2).

Tabela 2. Valores de escore-magenta e escore-H para imagens de carcinoma de colo uterino, colo normal e controles negativos

Categoria	N	Escore-magenta (média ± DP)	Escore-H (média ± DP)
Cancer	26	30,17 ± 11,10	147,54 ± 62,55
Normal	26	16,32 ± 3,95	29,04 ± 32,63
Controle negativo	15	13,28 ± 1,16	0 ± 0
<i>P</i> (Teste de Kruskal Wallis)		<0,001	<0,001

A maioria das imagens negativas para o escore-H (<50) demonstrou valores entre 10 e 20 no escore-magenta. Assim, para próximas comparações, tomou-se como ponte de corte de positividade no escore-magenta valores maiores ou iguais a 20 (figura 2).

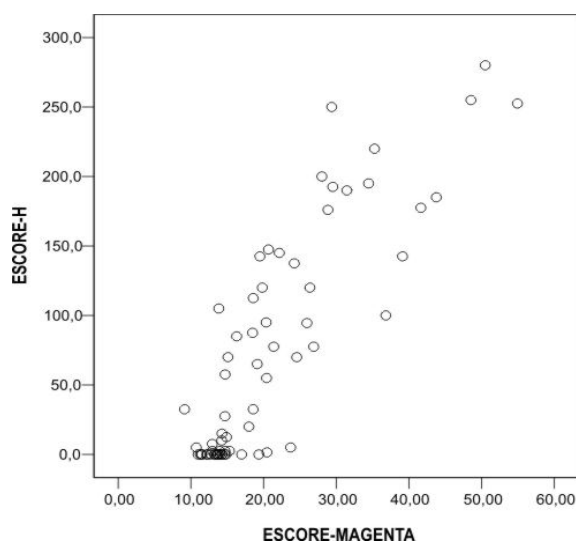


Figura 2. Correlação entre escore-H e escore-magenta. $r = 0.84$; $P < 0.001$

Quando casos foram considerados, não imagens individuais, todos os 10 casos de câncer foram positivos para COX-2 tanto no escore-H, quanto no escore-magenta. Para os controles negativos, todos os casos foram negativos para ambos os escores. Entre os casos normais, um caso foi classificado como positivo pelo escore-H e negativo pelo escore-magenta, enquanto outro caso foi o oposto, sendo classificado negativo pelo escore-H e positivo pelo escore-magenta. Em resumo, o escore-magenta mostrou concordância em 93.33% dos resultados do escore-H quanto a casos positivos e negativos. Resultados estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3. Classificação de casos por escore-magenta e escore-H.

		Escore-H ¹		
		Positivo	Negativo	Total
Escore-magenta ¹	Positivo	10 (90,9%)	1(9,1%)	11 (100%)
	Negativo	1 (5,3%)	18 (94,7%)	19 (100%)
Total ²		11	19	30

¹ Escore-H, casos positivos ≥ 50 ; escore-magenta, casos positivos ≥ 20

² Teste Exato de Fisher: $P < 0.001$

Em vista de que identificamos que o escore-magenta correlaciona-se fortemente com o escore-H em condições ideais, isto é, com iluminação e qualidade das imagens mantidas as mesmas durante toda a análise, também testamos a performance do escore-magenta em condições em que estes fatores variaram. O tamanho do arquivo de imagem não influenciou a média dos valores do escore-magenta, não havendo diferença estatística entre as médias de arquivos pequenos ($20,90 \pm 10,44$) e arquivos grandes ($21,01 \pm 10,39$) (Mann-Whitney U Test, $P=0,90$). Entretanto, o ajustamento de intensidade de luz do microscópio mostrou uma grande influência nos valores do escore-magenta, sendo que imagens claras apresentaram valores diminuídos do escore e imagens escuras, o oposto. Uma análise de apenas 3 casos foi suficiente para mostrar esta diferença (tabela 4).

Tabela 4. Variação nos valores do escore-magenta de acordo com diferentes ajuste de iluminação do microscópio

		Intensidade de luz do microscópio				
		Alta	Média	Normal	Baixa	Muito baixa
Escore-magenta	Caso 1	6,26	15,21	23,52	43,09	61,7
	Caso 2	7,22	16,41	25,06	44,52	62,99
	Caso 3	28,26	43,84	58,01	86,62	108,35
	Média ¹	13,91	25,15	35,53	58,08	77,68

¹ Teste de Kruskal Wallis: $P=0.045$

Finalmente, para compreendermos porque os valores do canal de cor magenta do sistema de cores CMYK foi melhor que os outros valores dos outros canais, inclusive de RGB, ou melhor que uma combinação deles, analisamos as diferenças de cores entre carcinomas e controles negativos para cada cor, RGB e CMYK. Magenta e amarelo foram as cores que mostraram a maior diferença entre casos positivos, que tinham coloração intensa pelo DAB, e casos negativos, que apresentavam somente o contraste do verde de metila (figura 3). Este resultado era obviamente esperado, uma vez que a cor marrom do DAB é composta principalmente de magenta e amarelo.

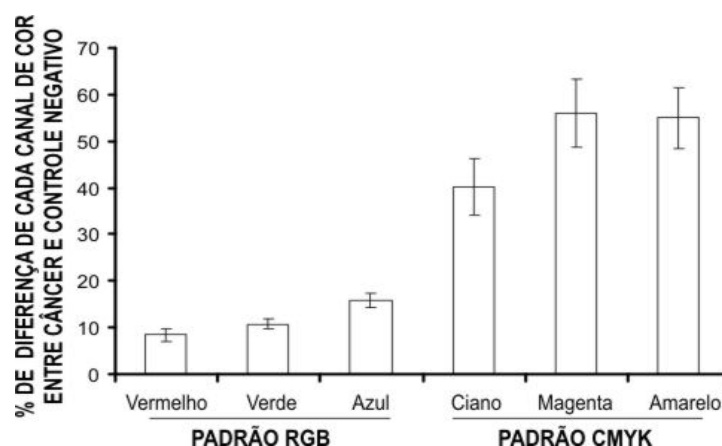


Figura 3. Diferenças das aferições em carcinomas e controles negativos para cada canal de cor do sistema RGB e CMYK, expressas em percentual. Note que o canal de cor magenta apresenta a maior diferença (média \pm DP, $55,98 \pm 7,28\%$) entre câncer e controles negativos, seguido pelo canal de cor amarelo ($54,97 \pm 6,49\%$). Valores de preto não estão disponíveis na conversão de RGB para CMYK pelo software.

DISCUSSÃO

Neste estudo apresentamos um novo e simples método de quantificar a reação de imunohistoquímica realizada com DAB e verde de metila, a qual apresenta uma forte correlação com escore-H. Este método é altamente objetivo e reprodutível, já que não é dependente da interpretação do observador e é realizado por meio de uma metodologia simples, com software de fácil manuseio. Além de sua objetividade, o método permite interpretação de nuances de coloração que a interpretação manual pode não observar. De acordo com nosso conhecimento, nenhum outro estudo descreveu esta técnica previamente.

O processo de carcinogênese no colo uterino desencadeado após a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) ainda está longe de ser completamente compreendido. À medida que desvendamos as etapas moleculares que levam ao carcinoma invasor, identificaremos marcos desse processo que poderão ser utilizados como biomarcadores para risco de progressão, de recidiva após tratamento ou de resistência à terapia. Ainda mais, a melhor compreensão do processo de malignização nos permitirá desenvolver melhores tratamentos para a doença, desde estágios pré-malignos até invasores.^{1,30} Mas não só o tratamento e o manejo clínico, mas também o rastreamento da doença será beneficiado, adicionado-se valor ao rastreamento citológico com a adição de outros testes.³¹

Assim como na pesquisa de outros tipos de câncer, IHC tem sido uma ferramenta poderosa na elucidação do processo de carcinogênese cervical. Em câncer de colo uterino e principalmente em suas lesões precursoras, as áreas alteradas podem ser pequenas e, assim, requerem técnicas para identificação de genes/proteínas que permitam visualização direta no tecido. Imunohistoquímica é ideal para isso. P16, por exemplo, tem sido utilizado como um marcador que se correlaciona fortemente com o grau de displasia.³⁰ A expressão de COX-2 também tem sido associada com o grau de gravidade dos carcinomas invasores e o tratamento com inibidores da COX-2 oferece uma nova opção em terapia.^{32,33}

Entretanto a subjetividade e reprodutibilidade da interpretação da IHC são importantes questões. Vários esforços têm sido realizados para superar esta limitação, como o uso de escores manuais padronizados (por exemplo, escore-H e escore-Q) e uso de análise auxiliada por computador. Entretanto, a análise digital costumeiramente requer treinamento, algoritmos complexos difíceis de compreender e software específico de, na maioria das vezes, alto custo.⁵⁻⁷

Ao invés de usar o sistema de cores RGB que vários estudos sobre análise digital utilizaram, desenvolvemos um escore utilizando o sistema de cores CMYK com bons resultados. RGB e CMYK são padrões de cores relacionadas. RGB é o sistema utilizado pelos aparelhos como monitores de computadores, câmeras e outros que emitem luz. As cores são divididas em vermelho, verde e azul e, por meio de sua combinação, todas as outras cores secundárias são formadas. Em vista de que o sistema RGB utiliza luz para criar suas imagens, é também chamado modelo aditivo de cores. Entretanto, enquanto monitores emitem luz, papéis impressos absorvem ou refletem ondas de luz através de outro sistema de cores, que é o sistema CMYK. Os pigmentos do padrão CMYK, ciano, magenta, amarelo e preto, servem como filtros, subtraindo várias tonalidades de vermelho, verde e azul da luz branca para produzirem todas as suas cores secundárias.

Em vista disso, o sistema CMYK é chamado de modelo subtrativo de cores. Uma imagem em RGB pode ser convertida facilmente para CMYK, e vice-versa, por programas simples de edição de imagens, como o utilizado neste estudo. Valores obtidos na análise de imagem em RGB também podem ser convertidos para CMYK por cálculos matemáticos.²⁴

Nossos dados demonstraram que os valores obtidos com os canais de cores RGB também apresentaram uma forte correlação com a interpretação manual das imunohistoquímicas, sendo capazes de distinguir os casos que foram corados com DAB. Na tabela 1, os escores 7 e 8, ambos derivados do formato RGB, apresentaram uma forte correlação com o escore manual, porém invertida. Estudos prévios já fizeram uso destes escores com resultados similares, mas a grande limitação destes é que os valores de cores obtidos do sistema RGB necessitam ser submetidos a cálculos para se chegar no escore final e a correlação é negativa, o que é potencialmente confuso.^{27,29}

Quando convertemos as imagens para CMYK, utilizando a ferramenta presente no software Corel Photo Paint, que também está presente em inúmeros outros softwares de baixo custo, identificamos que os valores do canal de cor magenta mostraram uma forte e positiva correlação com a interpretação manual do escore-H (tabela 1), mais fáceis de serem obtidos e interpretados que os escores derivados do sistema RGB. Esse potencial de distinção do magenta ocorreu porque esta cor foi isoladamente a que mais se diferenciou entre os casos negativos, corados somente com o contraste verde de metila, e os casos positivos corados com marrom do DAB. O canal amarelo também apresentou valores com marcada diferença entre casos e controles, mas a correlação com o escore-H foi mais baixa que magenta (Coeficiente de Correlação de Spearman, 0,76 vs. 0,84), provavelmente porque os casos negativos também apresentaram moderadamente a cor amarela.

A maioria dos estudos sobre interpretação de IHC com software de fácil manuseio refere-se à leitura da coloração nuclear com DAB e contracoloração com hematoxilina.^{4,16,20} De

acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a descrever metodologia simples de interpretação digital para coloração de citoplasma com DAB e contracoloração com verde de metila, o que é também uma combinação de colorações freqüentemente utilizada em imunohistoquímica.

Este método apresenta, entretanto, uma limitação quando à variação de iluminação das imagens. Imagens claras apresentaram uma acentuada diminuição dos valores do escore-magenta, enquanto imagens escuras mostraram altos valores. Este problema também foi relatado por outros autores e pode ser controlado mantendo-se o mesmo ajustamento de luz, tanto no microscópio quanto no software, durante todo o processo de obtenção das imagens.^{13,20} A imagem obtida com luminosidade não desejada pode ser corrigida no software de edição de imagens, entretanto, baseados em nossa experiência (dados não demonstrados), esse procedimento pode não ser suficiente e ainda assim termos desigualdade de luminosidade entre as imagens.

Em nosso estudo, 2 de 30 casos foram discordantes com o escore-H. Revendo o caso considerado negativo pelo escore-magenta (ponto de corte para positividade ≥ 20) e positivo pelo escore-H (ponto de corte para positividade ≥ 50), o valor do escore-magenta foi 16,63 e do escore-H, 61,67, ambos muito próximos dos limites estabelecidos. O segundo caso foi erroneamente classificado como positivo pelo escore-magenta porque se tratava de uma lâmina com reação inespecífica, com o anticorpo ligando-se à queratina (e não ao citoplasma). Na leitura manual, os patologistas prontamente consideraram com caso negativo, mas a leitura digital do tecido incluiu erroneamente a presença do cromógeno. Este erro também foi descrito por outros autores e pode ser facilmente evitado selecionando-se a área / caso para análise que não apresente coloração inespecífica.^{15,29}

O uso de análise digital de imunohistoquímica qualifica ainda mais este valioso método pois (a) podemos identificar pequenas diferenças de coloração nos tecidos, os quais

passariam despercebidamente aos olhos de patologistas, (b) diminui acentuadamente a subjetividade e reprodutibilidade de interpretação e (c) fornece valores que podem ser consistentemente ranqueados, ao invés de serem colocados na mesma categoria, possibilitando maior valor estatístico.

Em conclusão, o método descrito neste estudo é baseado em procedimentos simples que podem ser executados em um computador pessoal, utilizando-se software de baixo custo. Relativamente mais fácil que os procedimentos previamente descritos em sistema de cores RGB e comparável à interpretação manual utilizando-se o escore-H. O método é extremamente simples: após o arquivo da imagem ser aberto, com a região de interesse selecionada, apenas três cliques são necessários para completar a análise. Os resultados são objetivos e extremamente reprodutíveis, reduzindo a variabilidade intra e inter-observadores. Laboratórios e centros de pesquisa com recursos limitados podem se beneficiar com o uso desta técnica simples. Mais estudos devem ser realizados para avaliar a técnica em diferentes tecidos e com diferentes anticorpos.

8.2. Versão em inglês

**COMPUTER-ASSISTED IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF CERVICAL
CANCER BIOMARKERS USING LOW-COST AND SIMPLE SOFTWARE**

Luciano S. Hammes^{1 2}, Jeffrey E. Korte³, Rajeshwar Rao Tekmal², Paulo Naud¹, Maria Isabel Edelweiss⁴, Philip T. Valente⁵, Adhemar Longatto-Filho⁶, Nameer Kirma², João Sabino Cunha-Filho¹.

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA

³ Department of Biostatistics, Bioinformatics & Epidemiology, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA

⁴ Department of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁵ Department of Pathology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA

⁶ Life and Health Sciences Research Institute, School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal

Correspondence and reprints requests: Luciano S. Hammes, MD, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, TX 78229-3900, USA. Phone: +1. 210.567.4930. FAX: +1.210.567.4958. Email: hammes@cpovo.net.

Key-words: image analysis; computer assisted; immunohistochemistry; cervical cancer biomarker

Running Title: Computer-assisted immunohistochemistry

Acknowledgments: This work was supported by grant 0629/05-7 from the Foundation for the Coordination of Higher Education and Graduate Training (CAPES), Brazil, and by grant 05-154 from Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Incentive Fund (HCPA-FIPE), Brazil. We thank Mr. Gregory A. Langone, Ms. Joanne Click and Ms. Renata Pedrini for the technical assistance. We are also grateful to Nadine Clausell M.D. Ph.D. and Ms. Indara Carmin for the unique support for this project.

ABSTRACT

The study of biomarkers by immunohistochemistry (IHC) for cervical cancer and intraepithelial lesions is a promising field. However, manual interpretation of IHC and reproducibility of the scoring systems can be highly subjective.

In this article, we present a novel and simple computer-assisted IHC interpretation method based on cyan-magenta-yellow-black (CMYK) color format, for tissues with diaminobenzidine cytoplasmatic staining counterstained with methyl green.

A total of 67 microscopic images of cervical carcinoma, normal cervix and negative controls were analyzed in Corel Photo Paint X3 software in CMYK and red-green-blue (RGB) color format, and compared to manual H-score IHC assessments. The clearest and best positive correlation with the H-score was obtained using the image in CMYK color format and crude values of magenta color (Spearman Correlation Coefficient=0.84; agreement of 93.33%, $p < 0.001$). To obtain this value, only three steps were necessary: convert the image to CMYK format, select the area of interest for analysis and open the color histogram tool to visualize the magenta value.

This novel method is more easily interpreted than previous computer-assisted methods based on RGB color format and presents a strong correlation with the manual H-score. It is simple, objective, and requires only low-cost software and minimal computer skills.

INTRODUCTION

Immunohistochemistry (IHC) has been used to analyze, describe and compare the effects of several proteins involved in malignant diseases. In cervical cancer and especially cervical intraepithelial lesions, where the lesions are usually small, this method permits the visualization of protein expression in specific regions. While DNA/RNA analysis techniques can objectively detect the amount and activity of the protein in sample tissue, they may not accurately reflect the expression of the proteins under study, and may not detect their localization in situ. On the other hand, IHC can demonstrate how much and where this expression occurs in its histological context.^{1,2} IHC has also been used for the study of many other gynecological tumors such as breast, ovarian and endometrial tumors. In breast cancer, for example, IHC is routinely used for estrogen receptors, progesterone receptors and, more recently, HER2/neu proto-oncogene.^{3,4}

Currently, however, the interpretation of IHC can be highly subjective, prompting the need for more reliable and quantitative techniques. Many pathologists express IHC results based on the impression of the number of positive cells, relying upon an arbitrary cutoff that may range from 5 to 50%, with intensity of the reaction having little or no importance. Other manual scores, such as the H-score and the Q-score, give a final score with more detailed quantitative information based on categories of staining intensity and number/percentage of stained cells.⁵⁻⁷ Regardless of the scoring technique utilized, most are cumbersome and subject to high intraobserver and interobserver variability.^{8,9}

To provide a more objective and reproducible interpretation of IHC, many computer-assisted image analyses have been employed and have proven to be superior to manual visual interpretations, thereby lessening inter-observer variation and providing more accurate and detailed staining quantification.¹⁰⁻¹⁶ Many of the studies that use computer-assisted analyses, however, require complex procedures and expensive software that is often not available in many laboratories and research centers.^{14,17,18}

Other studies have relied upon low-cost software developed for graphic arts (e.g. Adobe Photoshop) and simple procedures for IHC image analysis, that provide good results for quantifying the chromogen reaction. These studies use the color system Red-Green-Blue (RGB) for image analysis, which is the system widely used for digital cameras and computer screens, with red, green and blue as primary colors. Most of these techniques include the use of diaminobenzidine (DAB) for nuclear staining and hematoxylin for counterstaining.^{4,11,12,16,19-24}

None of the studies that relied upon simple computer-assisted analyses have utilized the low-cost image software, Corel Photo Paint, that is also widely used for graphic arts. Additionally, there is no mention of a different type of IHC staining that is frequently used: cytoplasmatic DAB counterstained with methyl green. Moreover, the Cyan-Magenta-Yellow-Black (CMYK) color system, frequently used for printing and graphic images, has not been described for IHC image analysis. This color system is related to RGB, but instead of red, green and blue, the primary colors of CMYK are cyan, magenta, yellow and black. Finally, none of the studies that rely upon computer-assisted IHC analysis have investigated cervical neoplasia.

The aim of this study is to present and validate a simple and accurate technique for performing computer-assisted IHC analysis for cervical samples that are stained cytoplasmatically with DAB and counterstained with methyl green, using Corel Photo Paint

software and the CMYK color system, as compared to RGB color system and to manual interpretation using the H-score.

MATERIAL AND METHODS

Design

We performed a retrospective analysis of archival paraffin blocks of cervical biopsies from normal cervix and cervical carcinoma that were obtained from the Department of Pathology at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, from 2000 through 2003. Routine cervical biopsies were performed for cervical cancer screening, with samples fixed in formaldehyde and embedded in paraffin. Local ethics committee approval was obtained prior to any procedure.

Immunohistochemistry

Samples were cut at 4 μ m, with the first section stained for H&E for pathologic diagnosis and the following section stained for cyclooxygenase-2 (COX-2).

For IHC, slides were dried at 60°C for 20 minutes, deparaffinized in xylene, rehydrated through a graded ethanol series and then washed with distilled water. Antigen retrieval was achieved by boiling the tissues in citrate buffer, pH 6.0, for 20 minutes and then cooling the slides for 20 minutes. Slides were then placed in Sequenza semi-automated immunostainer (Thermo Electron Corporation; Waltham, MA).

IHC was performed with the avidin-biotin complex (ABC), using LV's Ultravision® Kit (Labvision Corporation; Fremont, CA), at room temperature, according to the manufacturer's instructions. Briefly, Hydrogen Peroxide Block was applied for 12 minutes to quench endogenous peroxidase activity, followed by Ultra V Block for 5 minutes to block biotin. Slides were incubated with primary antibody, rabbit monoclonal anti-COX-2 (Clone SP21; Labvision Corporation), diluted at 1:150, for 30 minutes. COX-2 primary antibody was chosen because of its very specific cytoplasmatic staining and because it presents a marked difference between normal cervix and cervical carcinoma.

Subsequently, biotinylated secondary antibody, goat anti-rabbit, was applied for 30 minutes, followed by streptavidin-peroxidase for 10 minutes. Immunoreactive complexes were detected using DAB chromogen exposure for 5 minutes. Finally, slides were counterstained with methyl green for 5 minutes, washed in distilled water, dehydrated in graded ethanol, cleared with xylene and mounted. Negative controls were obtained skipping the primary antibody. Breast carcinomas were used as an external positive control and cervical glandular cells were used as an internal positive control.

Imaging

For each case, 3 representative regions were chosen previously by a pathologist at H&E slides, blinded to IHC results, and then images were captured from immunostains. Each picture was acquired using a Nikon DXM 1200F digital camera microscope, Nikon ACT1 version 2.63 software, white-balanced, with 20X objective lens (Nikon; Melville, NY). Images were recorded in Red-Green-Blue (RGB) color mode, JPEG format (Joint Photographic Experts Group) in small files (\pm 500KB; 1,280 x 1,024 pixels). Brightness and color balance were adjusted to match the image seen through the lens on the first slide and kept the same for all pictures.

For further analysis, a group of pictures with high resolution ($\pm 5000\text{KB}$; $3,840 \times 3,072$ pixels) and varying microscope light adjustments were obtained. All images were stored and processed in a personal Windows-based PC, processor 2.00GHz, 512MB RAM.

Manual and Digital scoring assessment

Each image in a small file format, at 300AU (arbitrary units) of brightness (considered to be the standard microscope illumination) was analyzed by two blinded pathologists using the H-score.⁷ The percentages of cells with cytoplasmatic staining in each category (negative, weak, moderate or strong brown staining) were counted and the H-score was obtained according to the following formula:

$$\text{H-score} = (\% \text{ cells unstained} \times 0) + (\% \text{ cells stained weak} \times 1) + (\% \text{ cells stained moderate} \times 2) + (\% \text{ cells stained strong} \times 3).$$

The H-scores ranged from 0 (100% negative cells) to 300 (100% strong staining). The final H-score for each case was a mean of the 3 different areas and a mean of the pathologists' evaluations. A value at least 50 was considered positive.

The same images analyzed using the H-score underwent computer-assisted analysis, first using the RGB color system and then using the CMYK color system. Images using the RGB color system were opened in Corel Photo Paint X3 (Corel Corporation; Eden Prairie, MN) and the areas of interest, cancer or normal epithelium, were delimited using the "Freehand mask" tool. This software tool allows the user to exclude from analysis those areas that are not important for the analysis, such as cervical stroma or endocervical glands. After that, from the "Image" toolbar, the "Histogram" tool was opened and the mean values of red, green and blue channels were visualized. Simply described, a color

histogram is an analysis of an image derived by counting the number of pixels falling into each color category.

Next, the image was converted to the CMYK color system and the same “Histogram” procedure was performed. Mean values for cyan, magenta and yellow were recorded (figure 1). Values for black were not presented by the software since the images are the result of a transformation from another color format and the color black is omitted in this conversion. Similar to the H-score, the final RGB and CMYK values for each case were the mean of 3 different areas.

From the color data obtained, candidate scores that could represent DAB staining were calculated with a combination of different color channels. From the RGB color format analysis, we applied eight different candidate scores, as some previous authors have suggested²⁵⁻²⁹: 1) red value; 2) blue value; 3) green value; 4) red + blue; 5) green/blue; 6) 255-red; 7) blue – (0.3*(red + green)); 8) $(255 * \text{blue}) / (\text{red} + \text{green} + \text{blue})$. For the CMYK color format, 6 different candidate scores were tested: 9) cyan value; 10) magenta value; 11) yellow value; 12) magenta + yellow; 13) $(\text{magenta} / \text{cyan}) * 100$; 14) $(\text{magenta} * 100) / (\text{magenta} + \text{yellow})$.

Statistical Analysis

Values reported in this study are in arbitrary units. The correlation between computer-assisted candidate scores and the H-score were evaluated based on the Spearman Correlation Coefficient. Comparisons of variables with normal distributions were analyzed using the Student’s t-test, while comparison of variables with non-normal distributions were evaluated using the Mann-Whitney U test or the Kruskal-Wallis test. Two-by-two

contingency tables were evaluated by Fisher's Exact Test for agreement between evaluations . P-values under 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

A total of 26 images from 10 cervical carcinoma cases and 26 images from 10 normal cervix cases were selected for the study. Some small lesions generated less than 3 images. Additionally, 15 images of negative controls (5 cancers and 5 normal cervixes) were taken. In total, 67 pictures were included for analysis.

COX-2 expression was predominantly cytoplasmic, very specific to epithelial cells, with few inflammatory cells expressing the protein. Using the H-score interpretation, 92.3% of cancer pictures and 15.4% of normal cervix pictures were positive for COX-2. The mean H-scores (\pm standard deviation) for cancer, normal epithelium and negative control pictures were 158.65 ± 71.85 , 17.88 ± 26.23 and 0 ± 0 , respectively (Kruskal-Wallis test, $p < 0.001$).

With the histogram color values obtained from the RGB and CMYK analysis, we created different computer-assisted scores and compared them to the H-score. From all candidate scores, the gross magenta value obtained from the CMYK color system histogram (named Magenta-score) presented the best positive correlation with the H-score, with a correlation coefficient of 0.84 (table 1). An example of an immunohistochemical study using the Magenta-score is shown in figure 1.

Table 1. Correlation coefficients of computer-assisted scores and the H-score

Computer assisted scores		Spearman Correlation Coefficient	<i>p</i>	
RGB color format	Score 1	Red value	- 0.58	< 0.001
	Score 2	Blue value	- 0.72	< 0.001
	Score 3	Green value	- 0.76	< 0.001
	Score 4	Red + Blue	- 0.68	< 0.001
	Score 5	Green/Blue	0.77	< 0.001
	Score 6	255-Red	0.58	< 0.001
	Score 7	Blue – (0.3 * (Red + Green))	-0.82	< 0.001
	Score 8	(255*Blue) / (Red + Green + Blue)	-0.84	< 0.001
CMYK color format	Score 9	Cyan	0.57	< 0.001
	Score 10	Magenta	0.84	< 0.001
	Score 11	Yellow	0.76	< 0.001
	Score 12	Magenta + Yellow	0.79	< 0.001
	Score 13	(Magenta / Cyan) * 100	0.40	< 0.001
	Score 14	(Magenta*100) / (Magenta+Yellow)	0.04	0.6789

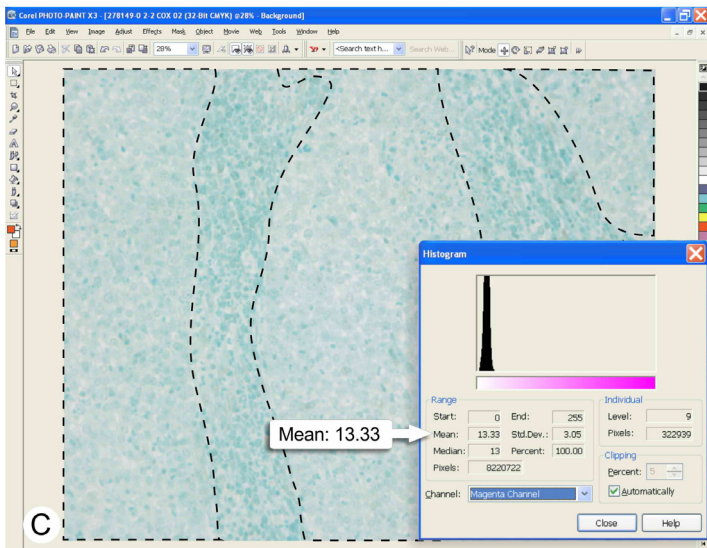
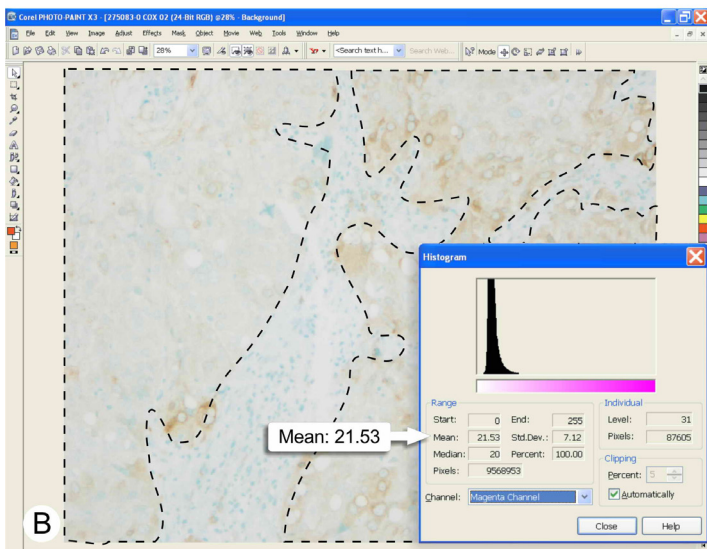
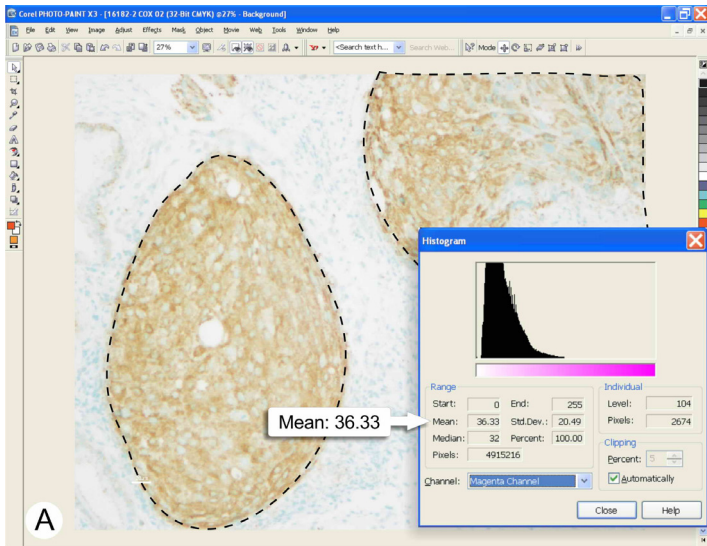


Figure 1. Histogram of samples showing (A) strong, (B) moderate and (C) negative COX-2 expression by IHC. Images were converted to the CMYK color system, the area of interest was selected and the histogram was generated to show the magenta channel value. Note that the magenta value correlates with staining intensity.

Like the H-score, the Magenta-score was statistically different for normal cases, cancer cases and negative controls (table 2).

Table 2. Magenta-Score and H-score values for pictures of normal cervix, cervical carcinoma and negative controls

Category	N	Magenta-score (mean±SD)	H-score (mean±SD)
Cancer	26	30.17 ± 11.10	147.54 ± 62.55
Normal	26	16.32 ± 3.95	29.04 ± 32.63
Negative Control	15	13.28 ± 1.16	0 ± 0
<i>p</i> (Kruskal Wallis Test)		<0.001	<0.001

Most of the negatives cases for the H-score (<50) obtained values between 10 and 20 on the Magenta-score. Therefore, an arbitrary cutoff of 20 on the Magenta-score was selected for further analysis (figure 2).

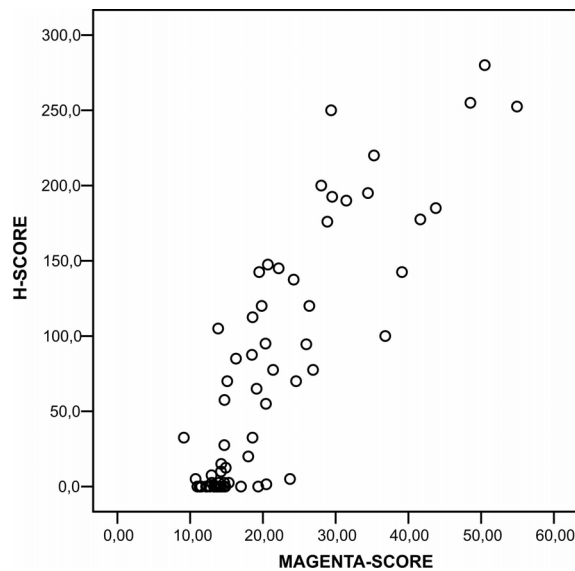


Figure 2. Correlation between the H-score and the Magenta-score. $r = 0.84$; $P < 0.001$

When cases as a whole were considered (not individual pictures), all of the 10 cancer cases tested were positive for COX-2 on both H-score and Magenta-score. For the 10 negative controls, all were negative for both scores. Among the normal cases, one case was classified positive by the H-score and negative by the Magenta-score and another case was the opposite, graded negative by the H-score and positive by the Magenta-score. In summary, the Magenta-score showed an agreement of 93.33% with the H-score. Results are summarized in Table 3.

Table 3. Classification of cases by the Magenta-score and H-score

		H-score ¹		
		Positive	Negative	Total
Magenta-Score ¹	Positive	10 (90.9%)	1(9.1%)	11 (100%)
	Negative	1 (5.3%)	18 (94.7%)	19 (100%)
Total ²		11	19	30

¹ Magenta-score, positive cases ≥ 20 ; H-score, positive cases ≥ 50 ;

² Fisher's Exact test: $p < 0.001$

Since we found that the Magenta-score correlates very strongly with the H-score under ideal conditions, where microscope illumination and picture quality were kept the same for all analyses, we also tested the performance of the Magenta-score under varying conditions. File size did not influence the mean Magenta-score, as demonstrated by no statistical difference between small files (20.90 ± 10.44) and large files (21.01 ± 10.39) (Mann-Whitney U Test, $P=0.90$). However, microscope light adjustment did have a strong influence on the Magenta-score, with bright pictures showing diminished values and dark pictures showing increased values. An analysis of only 3 cases was enough to show this difference (table 4).

Table 4. Variation in Magenta-score values under different microscope light adjustments

	Microscope light intensity				
	High	Medium	Normal	Low	Very low
Case 1	6.26	15.21	23.52	43.09	61.7
Magenta-Score Case 2	7.22	16.41	25.06	44.52	62.99
Case 3	28.26	43.84	58.01	86.62	108.35
Mean ¹	13,91	25,15	35,53	58,08	77,68

¹ Kruskal Wallis test: $P=0.045$

Finally, in order to understand why the magenta channel crude value from the CMYK color system performed better than any other value or combination of values for the purposes of distinguishing positive and negative staining, we analyzed the differences between carcinoma cases and negative controls for each color channel of RGB and CMYK. Magenta and yellow were the colors that showed the highest difference between the positive cases, with the brown staining of DAB, and negative cases, with the green staining of methyl green (figure 3). This result was obviously expected because the brown color of DAB is mainly composed of magenta and yellow.

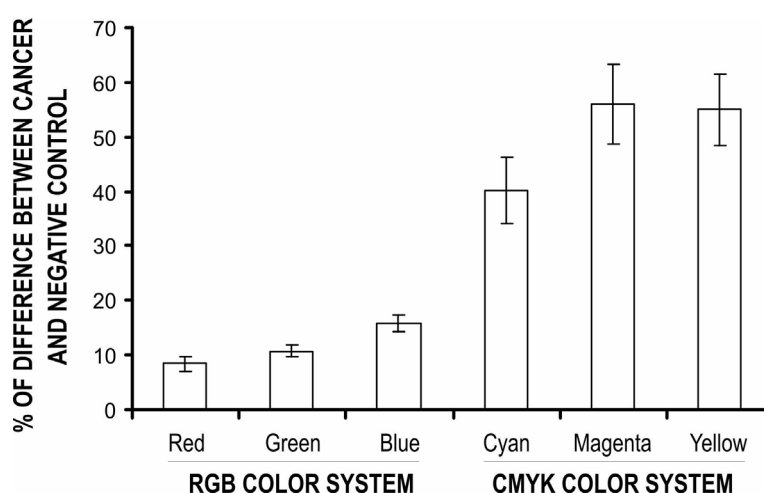


Figure 3. Differences in percentage of RGB and CMYK color system mean values between carcinoma and negative controls. Note that the magenta channel showed the highest percentage difference ($55,98 \pm 7,28\%$) between means values for cancer and negative controls followed by yellow ($54,97 \pm 6,49\%$). Values of black "K" not available when a RGB image was converted to CMYK by the software.

DISCUSSION

In this study, we have presented a novel yet simple method to measure DAB counterstained by methyl green that shows a strong correlation with the H-score. This method is highly objective and reproducible, since it is not dependent on human interpretation, and is performed by a simple technique with user-friendly software. In addition, it provides a quantitative assessment capable of distinguishing slight differences in staining intensity. Based on our knowledge, no other study has previously described this technique.

The carcinogenic process leading from cervical infection with human papillomavirus (HPV) to invasive cervical cancer is not completely understood. As we increase our discovery and understanding of biomarkers that may reflect crucial molecular steps in the carcinogenic process, we will be better able to identify women at risk of progression to more advanced disease including invasive carcinoma. Likewise, we will be better able to manage precursor lesions and plan cervical cancer treatment.^{1,30} Thus, not only treatments and clinical decisions, but also screening can be enhanced by the use of these biomarkers, adding value to the cytological exam.³¹ As in other many cancers, IHC is a powerful tool that has been used to elucidate the process of cervical carcinogenesis. In cervical cancer and especially CIN, lesions may be very small and require techniques for direct visualization of the gene/protein in the tissue. IHC is ideal for this process. P16, for example, has been used as a marker that correlates with the degree of dysplasia.³⁰ COX-2 expression has also presented a positive correlation with cervical carcinoma, and

treatment with COX-2 enzyme inhibitors offers a potential approach for improving cancer therapy.^{32,33}

However, IHC subjectivity and interpretation reproducibility have been important pitfalls. Many efforts have been made to overcome these problems, such as the use of manual scoring systems (for example, the H-score and the Q-score) and computer-assisted analysis of staining. Computer assisted methods of assessing immunohistochemical staining often require sophisticated computer skills, complex algorithms that are difficult to understand and specific (and sometimes costly) software.⁵⁻⁷

Instead of using the RGB color format that many other studies of computer-assisted IHC interpretation have used, we developed a score using the CMYK color format with better results. RGB and CMYK are related color systems. RGB is the color used by computer monitors, digital cameras and other devices that emit light. The color is divided into red, green and blue, and with their combination all secondary colors can be developed. Because the RGB color format uses light to display the colors, it is called an additive color model. Whereas monitors emit light, inked paper absorbs or reflects specific wavelengths, using commonly a different color system: CMYK. Cyan, magenta and yellow pigments from the CMYK system serve as filters, subtracting varying degrees of red, green and blue from white light to produce a selective gamut of spectral colors. Therefore, CMYK is the color system used for printing and is called a subtractive color model. RGB can be easily converted to CMYK (and vice versa) by simple photo-editors software, such as the one used in this study, or by mathematical calculation.²⁴

Our data demonstrated that values obtained from the RGB color format also show a strong correlation with manual IHC interpretation and are also capable of identifying the DAB brown staining. In Table 1, scores 7 and 8, both derived from the RGB color format, present an inverted and strong correlation with the H-score. Previous studies have applied those scores with similar good results, but the main limitation of this method for us was

that values from the RGB color system need to be submitted beforehand to mathematical calculations to be applicable for analysis, and the correlation was inverted and potentially confusing.^{27,29}

When we converted the image to the CMYK color system, using the conversion tool presented in Corel Photo Paint, which is also available in many other similar low-cost software applications, we found that the crude magenta value showed a strong and positive correlation with the H-score (table 1), easier to interpret than scores derived from RGB color format. This occurred because the magenta showed the highest difference between the positive cases, with the brown staining of DAB, and the negative cases, with the green staining of methyl green (table 5). The yellow channel also presented values with marked difference between cases and controls, but the correlation with the H-score was lower than magenta (Spearman Correlation Coefficient 0.76 vs. 0.84), probably because the negative cases also presented moderate yellow color.

Most of the studies using low-cost and user-friendly software for IHC analysis have referred to DAB nuclear staining and hematoxylin for counterstaining.^{4,16,20} To our knowledge, this is the first paper to describe DAB cytoplasmatic staining and methyl green counterstaining, which is a very common type of IHC staining, in computer-assisted IHC analysis using simple procedures.

One caveat for the use of the Magenta-score is due to the strong influence of image brightness. Bright images show a marked diminution of values for the score, while darker images show higher values. This limitation has been experienced for IHC by previous authors and can be controlled by maintaining the same light adjustment for microscope, camera and software during the entire process, allowing comparability between slides.^{13,20} The image brightness can also be corrected in the photo-editor software, even for extreme differences between dark/bright cases, but this is not recommended: based on our

experiments (data not shown), this procedure can alter the relative staining values obtained.

In our study, 2 cases out of 30 were discordant with the H-score (table 3). Reviewing the case considered negative by the Magenta-score (cutoff ≥ 20) and positive by the H-score (cutoff ≥ 50), the Magenta-score was 16.63 and the H-score was 61.67, both too close to our arbitrary threshold. The second case had a positive incorrect classification according to the Magenta-score because non-specific staining was read as positive staining. This difficulty was experienced by other authors and can be avoided by selecting the correct area/cases for analysis, where there is no nonspecific staining.^{15,29}

This computer-assisted technique for quantification of staining, in which tissues displaying slight differences in staining intensity can be consistently ranked rather than placed in the same staining “category”, presents an important opportunity for epidemiologic research into cancer etiology. Greater statistical power is provided by at least two factors: first, the ability to detect small differences in intensity, and second, the reduction in misclassification provided through computerized assessment of staining intensity. Studies assessing the importance of biomarker expression in cervical cancer cases vs. controls may benefit from increased statistical power when using a continuous measurement of staining intensity, rather than a dichotomous assessment of presence/absence of staining, or a categorical approach such as no/weak/strong staining.

In conclusion, the method described in this study is based on simple procedures that can be performed on a personal desktop computer using a low-cost software application. It is easier to use than the previous scores proposed for the RGB color format and comparable to manual H-score results. The method is simple: after the file has been opened, with the region of interest identified on the image, only 3 clicks are required for the analysis to be completed. The results are objective and extremely reproducible, reducing intra and inter-observer variability. Laboratories and research centers with limited resources may benefit

from the use of this simple technique. Further studies should be applied to different tissues and different antibodies.

8.3. Referências bibliográficas

1. Syrjanen KJ: Immunohistochemistry in assessment of molecular pathogenesis of cervical carcinogenesis. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005, 26:5-19
2. Unger ER, Steinau M, Rajeevan MS, Swan D, Lee DR, Vernon SD: Molecular markers for early detection of cervical neoplasia. *Dis Markers* 2004, 20:103-116
3. Hatanaka Y, Hashizume K, Kamihara Y, Itoh H, Tsuda H, Osamura RY, Tani Y: Quantitative immunohistochemical evaluation of HER2/neu expression with HercepTest™ in breast carcinoma by image analysis. *Pathol Int* 2001, 51:33-36
4. Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusano G, Gown AM: Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 1997, 45:1559-1565
5. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H: Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol* 2001, 25:1204-1207
6. Leong AS: Pitfalls in diagnostic immunohistology. *Adv Anat Pathol* 2004, 11:86-93
7. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M: A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1995, 48:876-878

8. Biesterfeld S, Veuskens U, Schmitz FJ, Amo-Takyi B, Bocking A: Interobserver reproducibility of immunocytochemical estrogen- and progesterone receptor status assessment in breast cancer. *Anticancer Res* 1996, 16:2497-2500
9. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Ruschoff J, Tomasic G, van de Vijver M: Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003, 16:173-182
10. Lehr HA, Jacobs TW, Yaziji H, Schnitt SJ, Gown AM: Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis. *Am J Clin Pathol* 2001, 115:814-822
11. Ruifrok AC, Katz RL, Johnston DA: Comparison of quantification of histochemical staining by hue-saturation-intensity (HSI) transformation and color-deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003, 11:85-91
12. Amin MR, Kurosaki M, Watanabe T, Tanaka S, Hori T: A comparative study of MIB-1 staining indices of gliomas measured by NIH Image analysis program and conventional manual cell counting method. *Neurol Res* 2000, 22:495-500
13. Atkin G, Barber PR, Vojnovic B, Daley FM, Glynn-Jones R, Wilson GD: Correlation of spectral imaging and visual grading for the quantification of thymidylate synthase protein expression in rectal cancer. *Hum Pathol* 2005, 36:1302-1308
14. Hatanaka Y, Hashizume K, Nitta K, Kato T, Itoh I, Tani Y: Cytometrical image analysis for immunohistochemical hormone receptor status in breast carcinomas. *Pathol Int* 2003, 53:693-699

15. Hasegawa T, Yamamoto S, Matsuno Y: Quantitative immunohistochemical evaluation of MIB-1 labeling index in adult soft-tissue sarcomas by computer-assisted image analysis. *Pathol Int* 2002, 52:433-437
16. Mofidi R, Walsh R, Ridgway PF, Crotty T, McDermott EW, Keaveny TV, Duffy MJ, Hill AD, O'Higgins N: Objective measurement of breast cancer oestrogen receptor status through digital image analysis. *Eur J Surg Oncol* 2003, 29:20-24
17. Matkowskyj KA, Schonfeld D, Benya RV: Quantitative immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength using commercially available software photoshop and matlab. *J Histochem Cytochem* 2000, 48:303-312
18. Matkowskyj KA, Cox R, Jensen RT, Benya RV: Quantitative immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength accurately measures receptor number. *J Histochem Cytochem* 2003, 51:205-214
19. Kirkeby S, Thomsen CE: Quantitative immunohistochemistry of fluorescence labelled probes using low-cost software. *J Immunol Methods* 2005, 301:102-113
20. Vilaplana J, Lavielle M: A method to quantify glial fibrillary acidic protein immunoreactivity on the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Methods* 1999, 88:181-187
21. Lahm A, Uhl M, Lehr HA, Ihling C, Kreuz PC, Haberstroh J: Photoshop-based image analysis of canine articular cartilage after subchondral damage. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004, 124:431-436
22. Dahab GM, Kheriza MM, El-Beltagi HM, Fouda AM, El-Din OA: Digital quantification of fibrosis in liver biopsy sections: description of a new method by Photoshop software. *J Gastroenterol Hepatol* 2004, 19:78-85

23. Lehr HA, van der Loos CM, Teeling P, Gown AM: Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J Histochem Cytochem* 1999, 47:119-126
24. Long B: Complete Digital Photography. Hingham, Massachusetts, USA, Charles River Media, 2005
25. King TW, Brey EM, Youssef AA, Johnston C, Patrick CW, Jr.: Quantification of vascular density using a semiautomated technique for immunostained specimens. *Anal Quant Cytol Histol* 2002, 24:39-48
26. Smejkal GB, Shainoff JR: Enhanced digital imaging of diaminobenzidine-stained immunoblots. *Biotechniques* 1997, 22:462
27. Ruifrok AC: Quantification of immunohistochemical staining by color translation and automated thresholding. *Anal Quant Cytol Histol* 1997, 19:107-113
28. Montironi R, Diamanti L, Thompson D, Bartels HG, Bartels PH: Analysis of the capillary architecture in the precursors of prostate cancer: recent findings and new concepts. *Eur Urol* 1996, 30:191-200
29. Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick CW, Jr.: Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J Histochem Cytochem* 2003, 51:575-584
30. Padilla-Paz LA: Emerging technology in cervical cancer screening: status of molecular markers. *Clin Obstet Gynecol* 2005, 48:218-225
31. Gray LJ, Herrington CS: Molecular markers for the prediction of progression of CIN lesions. *Int J Gynecol Pathol* 2004, 23:95-96

32. Dai Y, Zhang X, Peng Y, Wang Z: The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005, 97:96-103

33. Kim SH, Song SH, Kim SG, Chun KS, Lim SY, Na HK, Kim JW, Surh YJ, Bang YJ, Song YS: Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004, 130:551-560

9. ARTIGO CIENTÍFICO 2

9.1. Versão em português

AUMENTO DA EXPRESSÃO DE VEGF, C-FMS E COX-2 ACOMPANHA A
PROGRESSÃO DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC) PARA CÂNCER
INVASOR

Luciano S. Hammes^{1 2}, Rajeshwar Rao Tekmal², Paulo Naud¹, Maria Isabel Edelweiss³, Philip T. Valente⁴, Nameer Kirma², K Syrjänen⁵, João Sabino Cunha-Filho¹.

¹ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas em San Antonio, San Antonio, Texas, Estados Unidos

³ Departamento de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

⁴ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas em San Antonio, San Antonio, Texas, Estados Unidos

⁵ Departamento de Oncologia e Radioterapia, Hospital Universitário de Turku, Finlândia

Correspondências e solicitação de cópias: Dr. Luciano S. Hammes, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas em San Antonio, San Antonio, Texas, Estados Unidos. End: 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, TX 78229-3900, USA. Telefone: +1. 210.567.4930. Fax: +1.210.567.4958. E-mail: hammes@cpovo.net.

Palavras-chave: fator de crescimento vascular endotelial, receptor do fator estimulador de colônia de macrófagos, ciclooxigenase-2, imunohistoquímica, neoplasia intraepitelial cervical, câncer cervical, progressão de doença, angiogênese, biomarcador.

Título resumido: VEGF, c-fms, COX-2 e câncer cervical.

Agradecimentos: este trabalho foi apoiado pelo contrato 0629/05-7 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pelo contrato 05-154 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Fundo de Incentivo à Pesquisa (HCPA-FIPE), Brasil, e pelo Estudo Latinoamericano de Rastreamento (*Latin America Screening Study – LAMS Study*) da Comunidade Econômica Européia (INCO-DEV ICA4-CT-2001-10013). Agradecemos Sr. Gregory A. Langone, Sra. Joanne Click e Srta. Renata Pedrini pela ajuda técnica. Também somos gratos à Profa.. Nadine Clausell Ph.D. e Sra. Indara Carmin pelo apoio a este estudo.

RESUMO

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) tem sido descrito como um potente fator angiogênico, porém sua relação com outros marcadores moleculares – c-fms (proto-oncogene receptor do fator estimulador de colônia de macrófagos) e COX-2 (ciclooxigenase 2) – é pobremente compreendido no processo de carcinogênese cervical.

Com o objetivo de avaliar esta relação, amostras de 26 cérvices normais, 28 lesões escamosas intraepiteliais cervicais de baixo grau (*low-grade squamous intraepithelial lesions*, LSIL), 30 lesões escamosas intraepiteliais cervicais de alto grau (*high-grade intraepithelial lesions*, HSIL) e 28 carcinomas de células escamosas (*squamous cells carcinoma*, SCC) foram analisados por imunohistoquímica para VEGF, c-fms e COX-2. Para cada marcador, a intensidade da reação foi avaliada com escore-H, utilizando-se ponto de corte de 50 (variação de 0 a 300).

O percentual de positividade em epitélio de cérvix normal, LSIL, HSIL e SCC foi, respectivamente: (a) VEGF - 11,5%, 39,3%, 53,3% e 75% ($P<0,001$); (b) c-fms - 0%, 10,7%, 40% e 67,9%, ($P<0,001$); e (c) COX-2 - 7,7%, 39,3%, 80% e 100%, ($P<0,001$). A expressão estromal de VEGF e de c-fms também se correlacionou com a gravidade das lesões, sendo que VEGF estromal mostrou-se mais intenso que epitelial, enquanto c-fms foi fracamente positivo no estroma em relação ao epitélio. A expressão de COX-2 no estroma foi esparsa e não foi influenciada pelo grau das lesões. VEGF mostrou-se estatisticamente relacionado à expressão de c-fms e COX-2 em HSIL ($P=0,020$ e

$P=0,027$, respectivamente) e SCC ($P=0,015$ e $P=0,005$, respectivamente), mas a co-expressão de um ou de outro não foi indispensável para a expressão de VEGF. Considerando-se apenas lesões intraepiteliais, a expressão de c-fms estava associada a HSIL (OR=5,56; IC 95%, 1,19-29,32; $P=0,025$) e também COX-2 estava associada a HSIL (6,18; 1,67-24,01; $P=0,004$), enquanto VEGF não mostrou associação.

Concluimos que a expressão de VEGF foi considerada um evento precoce, com intensa participação do estroma, mostrando associação à expressão de c-fms e COX-2. C-fms e COX-2 devem ser considerados como marcadores potenciais para risco de progressão de NIC já que estavam associados a HSIL. Nossos dados também mostram que VEGF, c-fms e COX-2 são possíveis alvos moleculares para prevenção e tratamento do câncer cervical já sua expressão está intimamente correlacionada com o processo de carcinogênese cervical.

INTRODUÇÃO

Por décadas, a neovascularização (angiogênese) associada à progressão de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para carcinoma invasor tem sido descrita pelo exame de colposcopia.¹ Mais recentemente, a avaliação detalhada por microscopia confirmou este aumento da angiogênese durante o processo de malignização da cérvix uterina, não somente nas lesões, mas também no tecido benigno periférico.^{2,3}

A angiogênese é um passo fundamental para a proliferação celular, invasão e desenvolvimento de metástases em tumores. É amplamente aceito que para o crescimento tumoral agressivo é necessário que ocorra um aumento proporcional do suprimento vascular. Neste processo, uma grande variedade de fatores de crescimento pró-angiogênicos são produzidos pelas células tumorais, células inflamatórias e células estromais.^{4,5} Entre estes estímulos, o fator de crescimento vascular endotelial (*endothelial vascular growth factor*, VEGF) tem sido descrito como um potente fator angiogênico em vários tumores ginecológicos e inúmeros estudos indicam que a expressão aumentada de VEGF acompanha a transformação maligna de lesões precursoras.^{3,6-14}

Em células de mamíferos, a família de VEGF é composta de 5 subtipos: A, B, C, D e fator de crescimento placentário (PIGF). Adicionalmente, proteínas que são estruturalmente relacionadas ao VEGF existem em vírus parapox (VEGF-E) e peçonha de cobras (grupo de proteínas denominadas VEGF-Fs). VEGF-A é o mais importante subtipo em relação a angiogênese, estando intimamente correlacionado ao processo de criação e também

manutenção de vasos sanguíneos. Cinco isoformas de VEGF-A são descritas: VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A189 and VEGF-A206. Neste estudo, iremos referir VEGF-A simplesmente como VEGF.^{5,15}

Vários fatores regulam a expressão de VEGF, incluindo alterações teciduais como hipóxia, stress oxidativo e mecânico, privação de glicose, acidose, citocinas e oncogenes.⁵ Em tecidos tumorais, mutações de oncogenes e de genes supressores de tumores, com conseqüente produção de determinadas citocinas, são freqüentemente associados a alta expressão de VEGF e conseqüente angiogênese.⁵

Dos fatores que influenciam a produção de VEGF, o proto-oncogene receptor de fator estimulador de colônia de macrófagos (*macrophage colony stimulating factor receptor, c-fms*) e a enzima ciclooxygenase 2 (COX-2) têm sido estudados em vários tumores humanos, porém sua expressão em câncer cervical e lesões precursoras é incompletamente compreendido.¹⁶⁻²⁵

C-fms foi primeiramente descrito como receptor celular responsável por diferenciação, proliferação e ativação de fagócitos mononucleares.²⁶ Entretanto, a expressão anormal de c-fms com ou sem seu ligante, fator estimulador de colônia de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor, CSF-1*), tem sido documentada em uma ampla variedade de tumores epiteliais, incluindo carcinoma de mama, ovário, endométrio, pulmões, rins, pâncreas e próstata.^{27,28} C-fms é um homólogo celular do oncogene retroviral de sarcoma felino (*feline sarcoma retrovirus oncogene, v-fms*) e sua ativação ocasiona intensificação de inúmeras vias que controlam proliferação e diferenciação celular.^{29,30} Fortes evidências sugerem que c-fms possa promover angiogênese por meio de um aumento na expressão de VEGF, tanto em condições benignas, como em tecidos tumorais.^{16,17,31,32} Entretanto, estudos sobre o envolvimento de CSF-1/c-fms em desenvolvimento de NIC e carcinomas cervicais escamosos (*squamous cell carcinoma*,

SCC) são extremamente raros e, ainda mais, não existem estudos sobre sua interação com VEGF em patologia cervical.³³⁻³⁶

COX-2 é a enzima responsável pela conversão de ácido aracdônico em prostaglandinas, sendo indetectável na maioria dos tecidos normais. COX-2 é especificamente induzida em tecidos inflamatórios e neoplásicos, duas condições geralmente associadas à angiogênese. COX-2 também estimula a proliferação celular, promove resistência a apoptose e inibe a resposta imune. COX-2 pode promover angiogênese através de diferentes maneiras: aumento direto da produção de VEGF; estímulo de crescimento, migração e formação tubular de células endoteliais pelos seus eicosanóides; aumento da sobrevivência de células endoteliais por inibição de proteínas apoptóticas; diminuição de inibidores de angiogênese; aumento de metaloproteinases que degradam a matriz extracelular permitindo invasão vascular.^{37,38} A associação entre COX-2 e VEGF tem sido documentada em vários tumores como de bexiga, estômago, pâncreas, cabeça e pescoço, intestino, pulmão, ovário, mama e endométrio.^{18-25,39}

Evidências recentes indicam que COX-2 também está envolvida no processo de carcinogênese cervical, estando associada a gravidade dos achados, metástases e pior prognóstico.^{11,40-46} Entretanto, o papel de COX-2 em NIC foi avaliado por poucos estudos.^{8,47-50} Da mesma maneira, relatos sobre a relação de COX-2 e VEGF em câncer cervical são restritos.^{8,11,51,52} E, além disso, ainda mais raros quando em relação a NICs.⁸

O presente estudo objetiva analisar a expressão de VEGF, c-fms e COX-2, e suas relações mútuas, nos diferentes estágios da carcinogênese cervical para melhor compreender este processo e também para avaliá-los como potenciais marcadores de risco de progressão da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento e seleção das amostras

Biópsias realizadas em mulheres rastreadas para câncer cervical entre 2000 e 2003 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil, foram selecionadas para análise. As pacientes eram rotineiramente testadas para papilomavírus humano de alto risco (HPV) por Captura Híbrida II (Digene Corporation; Gaithersburg, MD, EUA). Amostras de cérvix normal foram selecionadas de biópsias de mulheres que eram sabidamente negativas para HPV de alto risco, a fim de garantir a normalidade das amostras. Amostras de cérvix normal e NIC foram provenientes de uma coorte de pacientes rastreadas pelo Estudo Latino-americano de Rastreamento (*Latin America Screening Study, LAMS Study*), enquanto carcinomas invasores foram selecionados de amostras de pacientes que foram tratadas no mesmo período, no mesmo hospital, mas que não faziam parte da coorte LAMS. Todas as biópsias foram fixadas em formaldeído e embebidas em parafina de acordo com a rotina do laboratório. Aprovação do Comitê de Ética Local foi obtida antes de qualquer procedimento.

Seleção de regiões para análise

As amostras foram seccionadas com espessura de 4 μ m, sendo o primeiro corte corado em hematoxilina-eosina (H&E) para confirmar o diagnóstico histológico por dois

patologistas independentes. Os cortes seguintes foram processados por imunohistoquímica (IHC) para detecção de VEGF, c-fms e COX-2. Em cada lâmina corada por H&E, em média três regiões representativas eram demarcadas sob microscopia, aumento de 200X, de maneira cegada aos resultados de IHC, para posterior análise nas lâminas de IHC. Esse procedimento assegurava que exatamente a mesma região seria interpretada em cada procedimento de IHC e que regiões realmente com lesões seriam avaliadas.

As amostras foram categorizadas em cérvix normal, lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (*low grade squamous intraepithelial lesion*, LSIL, equivalente a NIC 1), lesão escamosa intraepitelial de alto grau (*high grade squamous intraepithelial lesions*, HSIL, equivalente a NIC 2 e 3) e SCC.

Imunohistoquímica

Para proceder-se a IHC, as lâminas foram secadas a 60°C por 20 minutos, desparafinizadas em xilol, reidratadas através de vários gradientes de álcool e finalmente lavadas com água destilada. Recuperação dos epítomos para COX-2 foi obtida fervendo-se as lâminas em solução tampão de citrato, pH 6,0, por 20 minutos e esfriando-as por mais 20 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para os epítomos de VEGF, entretanto utilizou-se solução tampão de 1mM de ácido etilendiamino tetra-acético (*ethylenediaminetetracetic acid*, EDTA), pH 8,0. As lâminas de c-fms não foram submetidas à recuperação de epítomos. Posteriormente, as lâminas foram dispostas em bandejas semi-automáticas para realização de IHC. (Sequenza, Thermo Electron Corporation; Waltham, MA, EUA).

IHC foi realizada pela reação do complexo de avidina-biotina (ABC), utilizando-se reagentes LV's Ultravision (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), em temperatura ambiente (TA), de acordo com as orientações do fabricante. Bloqueador de Peróxido de Hidrogênio foi aplicado por 12 minutos, seguido por bloqueador Ultra-V por 5 minutos para bloqueio de biotina. As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário: anticorpo monoclonal de coelho anti-VEGF humano, diluído na proporção de 1:150, por 40 minutos em TA (reage com VEGF-A, aminoácidos variantes 121, 165 e 189; cat #RB-9031; Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA); anticorpo policlonal de coelho anti-c-fms humano, diluído em 1:50, por 12 horas em 4°C (cat #CBL776; Chemicon International; Temecula, CA, USA); anticorpo monoclonal de coelho anti-COX-2 humano diluído em 1:150 por 30 minutos em TA (cat #RB-9072; Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA).

Posteriormente, anticorpo secundário ligado à biotina foi aplicado por 30 minutos, sendo seguido por estreptavidina-peroxidase por 10 minutos. Finalmente, a reação foi revelada com a aplicação do cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. Como passo final, as lâminas foram contracoradas com verde de metila por 5 minutos, lavadas em água destilada, desidratadas em gradientes de álcool e protegidas com lamínula. Controles negativos foram processados concomitantemente omitindo-se o anticorpo primário. Controles positivos externos para VEGF, c-fms e COX-2 foram obtidos de amostras de angiosarcoma, amígdala e carcinoma colônico humanos, respectivamente. Em vista de ser tecnicamente impossível manejar todas as lâminas ao mesmo tempo, cada procedimento de IHC continha a mesma proporção de amostras normais, LSIL, HSIL, SCC, controles negativos e positivos.

Interpretação

As regiões previamente selecionadas na coloração H&E foram fotografadas nas lâminas de H&E e IHC utilizando-se microscópio com câmera digital Nikon DXM 1200F(Nikon; Melville, NY, EUA), magnificação de 200X. O percentual de células em cada categoria de coloração citoplasmática (negativo, fraco, moderado ou forte) foi contado e o escore-H obtido com a seguinte fórmula:

$$\text{Escore-H} = (\% \text{ células sem coloração} \times 0) + (\% \text{ células fracamente coradas} \times 1) + (\% \text{ células moderadamente coradas} \times 2) + (\% \text{ células fortemente coradas} \times 3)$$

Por conseguinte, o escore-H variou entre 0 (100% de células negativas) e 300 (100% de células fortemente coradas). Epitélio escamoso e estroma foram incluídos igualmente em cada imagem e foram avaliados individualmente para IHC. Valores maiores ou iguais a 50 no escore-H foram considerados positivos

Análise Estatística

Os valores da IHC foram apresentados de duas maneiras: (a) para demonstrar a expressão de cada anticorpo em tecido normal, LSIL, HSIL e SCC, cada caso foi considerado uma média de todas as suas regiões analisadas; e (b) para avaliar a associação de c-fms, COX-2 e VEGF, cada região analisada foi considerada como uma medida individual.

Comparação das médias do escore-H entre os tipos de lesão foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e comparação das proporções, com Qui-quadrado de Pearson. Modelos de regressão linear em etapas foram utilizados para testar a correlação da expressão de c-fms e COX-2 com VEGF. Risco foi calculado em razões de

chance (odds ratio, OR) e intervalos de confiança (IC) de 95%. Em todos os testes, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Em vista dos valores obtidos no escore-H apresentarem distribuição assimétrica, eles são relatados em mediana e percentis 25 e 75.

O cálculo de poder realizado antes do estudo indicou que seriam necessários 28 pacientes em cada categoria para alcançarmos um poder de 80%, com IC de 95%. Para confirmar que nossos resultados não foram devido ao acaso, repetimos o cálculo de poder utilizando os dados obtidos e encontramos poder de 99,80% para análise de VEGF e 100% para c-fms e COX-2.

RESULTADOS

O estudo incluiu 112 pacientes divididas em 26 casos normais, 28 LSIL, 30 HSIL e 28 SCC. Ao total, destes casos, 324 diferentes regiões foram analisadas.

Encontramos uma direta relação entre a gravidade das lesões e aumento de expressão de VEGF, tanto em epitélio escamoso, quanto em estroma (figuras 1). Epitélio normal, LSIL, HSIL e SCC foram considerados positivos para expressão de VEGF em 11,5%, 39,3%, 53,3% e 75% dos casos, respectivamente ($P < 0,001$), enquanto o estroma adjacente foi positivo em 15,4%, 53,6%, 96,7% e 89,3% dos casos, respectivamente ($P < 0,001$).

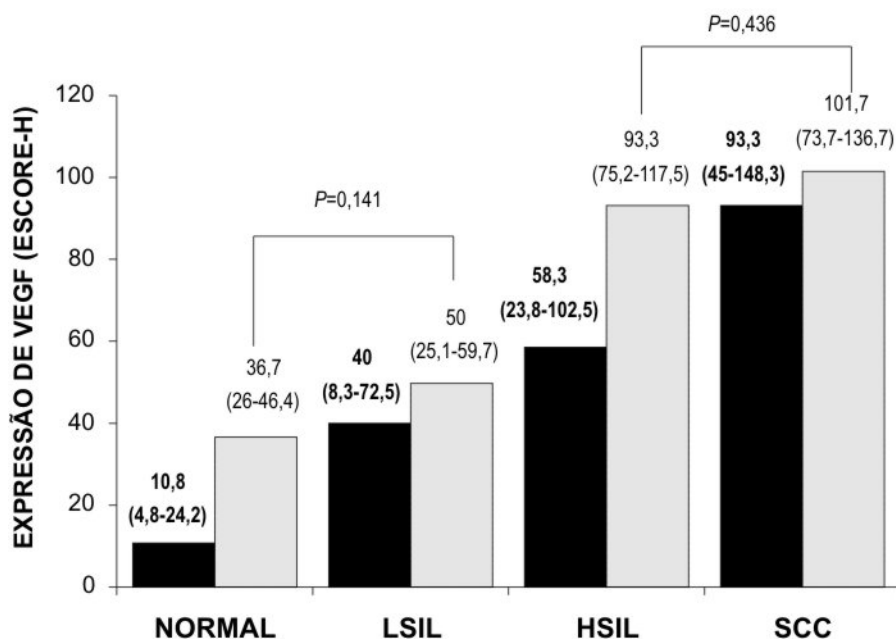


Figura 1. Expressão de VEGF em epitélio escamoso (colunas pretas) e estroma (colunas cinzas) de casos normais, LSIL, HSIL e SCC. A expressão epitelial de VEGF foi estatisticamente diferente entre todas as categorias (Teste de Kruskal-Wallis, $P < 0,001$). Entretanto, na expressão estromal de VEGF, não houve diferença entre casos normais e LSIL (Teste de Mann-Whitney U, $P=0,141$) e entre casos de HSIL e SCC (Teste de Mann-Whitney U, $P=0,436$). Todas as outras comparações em estroma foram diferentes estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $P < 0,001$). Valores apresentados em mediana (percentis 25 e 75).

A expressão de c-fms também foi analisada por IHC ao longo das etapas de transformação maligna da cérvix uterina. A expressão epitelial e estromal de c-fms apresentou um aumento correlacionado com a gravidade das lesões (figura 2). Entretanto, a expressão no epitélio foi notavelmente mais intensa que a expressão no estroma em todas as categorias, com exceção dos casos normais (Teste de Mann-Whitney U, $P=0.218$). Cérvix normal, LSIL, HSIL e SCC apresentaram positividade para c-fms no epitélio escamoso de 0%, 10,7%, 40% and 67,9% dos casos, respectivamente ($P<0.001$).

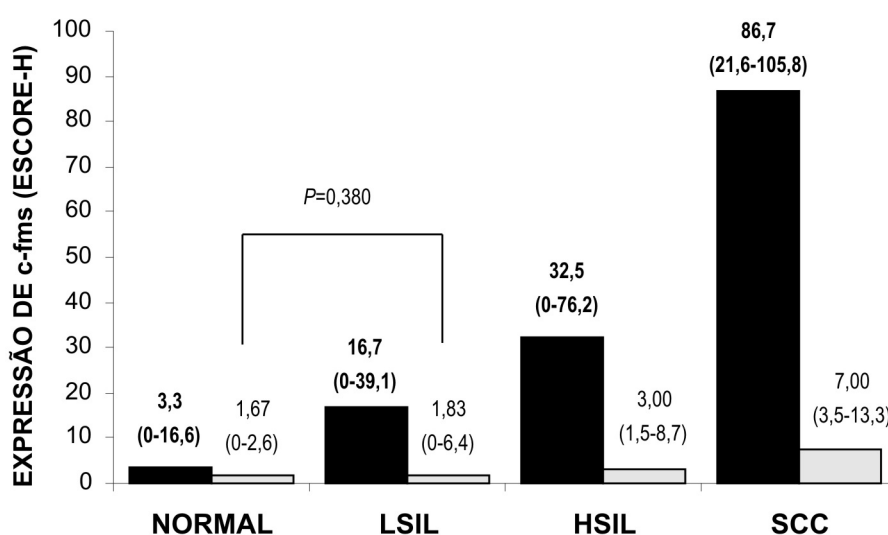


Figura 2. Expressão de c-fms em epitélio escamoso (colunas pretas) e estroma (colunas cinzas) de casos normais, LSIL, HSIL e SCC. A expressão epitelial de c-fms foi diferente entre todas as categorias analisadas (Teste de Kruskal-Wallis, $P<0,001$). Em estroma, c-fms não foi diferente entre cérvix normal e LSIL (Teste de Mann-Whitney U, $P=0,380$), mas foi diferente entre todas as outras categorias (Teste de Kruskal-Wallis, $P=0,010$). Valores apresentados em mediana (percentis 25 e 75).

A expressão epitelial de COX-2 apresentou um aumento gradual de acordo com a gravidade das lesões, sendo positivo em 7,7%, 39,3%, 80% e 100% dos casos normais, LSIL, HSIL e SCC, respectivamente ($P<0.001$) (figura 3). Entretanto, esta tendência não foi identificada no estroma, a qual foi diferente apenas entre cérvix normal e HSIL.

Interessantemente, encontramos uma constante expressão de COX-2 em tecido glandular cervical, presente desde tecido benigno até casos de carcinoma, mas estes dados não foram incluídos na análise se tratar de outro tipo de epitélio (Figura 4).

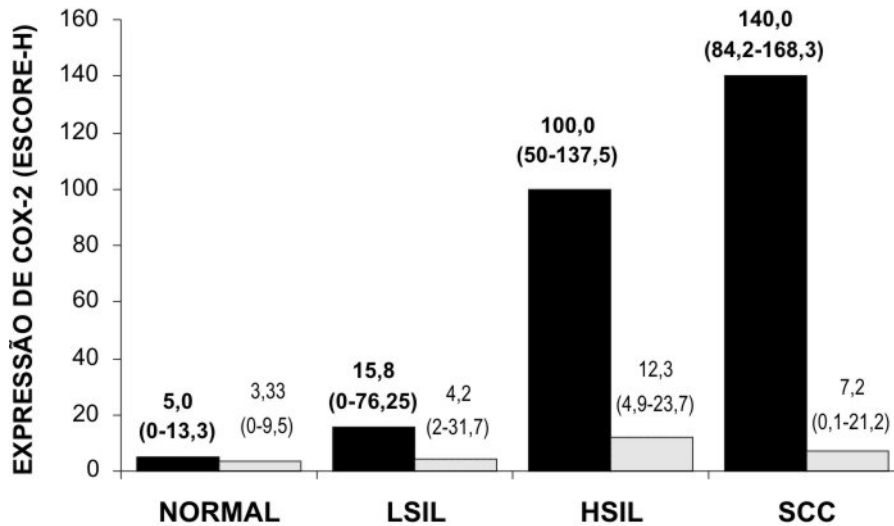


Figura 3. Expressão de COX-2 em epitélio escamoso (colunas pretas) e estroma (colunas cinzas) de cérvix normal, LSIL, HSIL e SCC. A expressão epitelial de COX-2 foi diferente entre todas as categorias analisadas (Teste de Kruskal-Wallis, $P < 0,001$), mas no estroma esta diferença não foi identificada (Teste de Kruskal-Wallis, $P < 0,054$). Em relação ao estroma, a única diferença identificada foi entre cérvix normal e HSIL (Teste de Mann-Whitney U, $P = 0,003$). Valores apresentados em mediana (percentis 25 e 75).

As figuras 4 e 5 apresentam exemplos de resultados de IHC para VEGF, c-fms e COX-2.

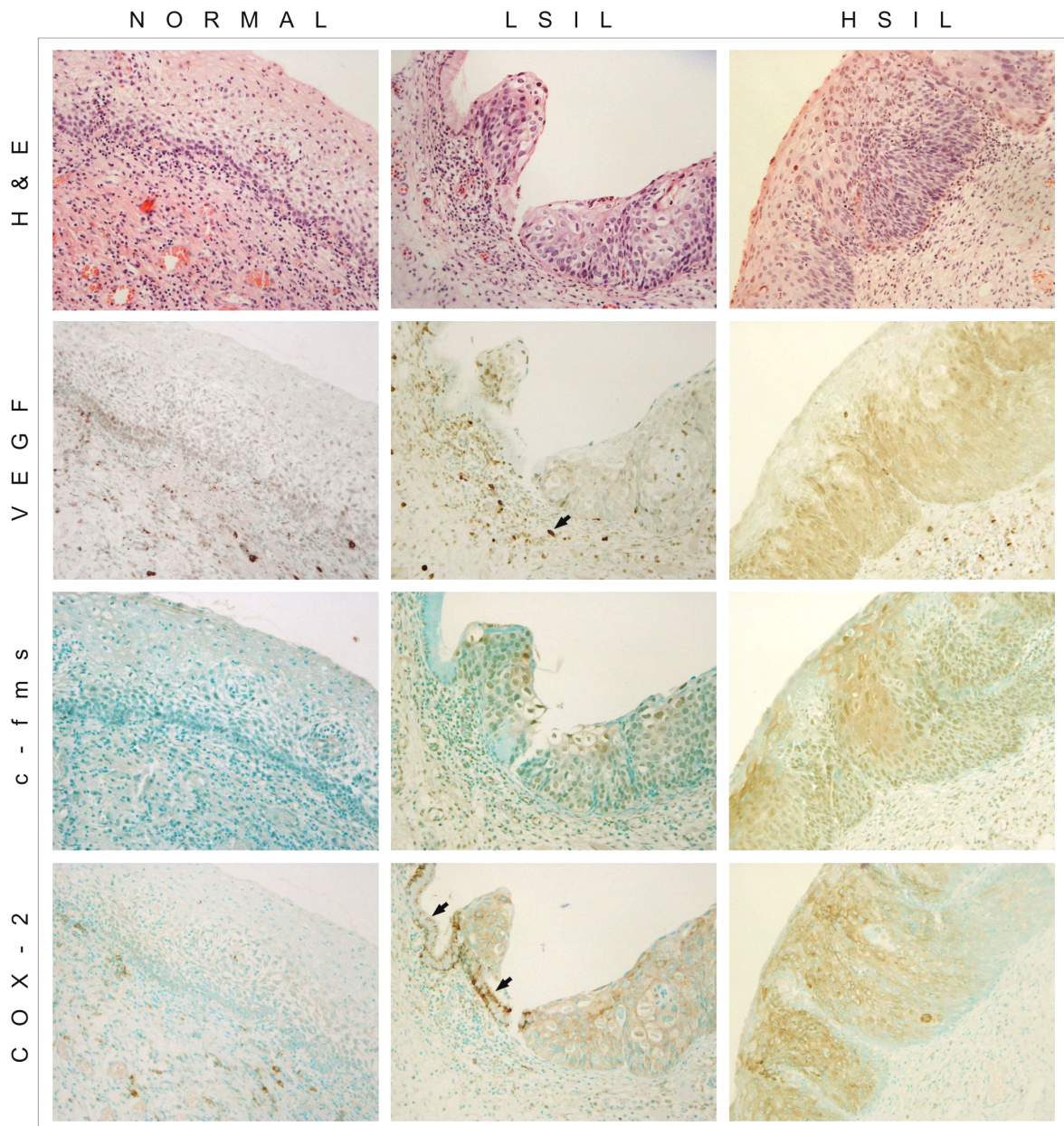


Figura 4. Coloração em H&E e imunohistoquímica para VEGF, c-fms e COX-2 em tecido normal e NICs. Primeira linha: áreas pré-selecionadas em H&E de regiões representativas de cérvix normal, LSIL e HSIL. **Segunda linha:** cérvix normal com discreta expressão citoplasmática de VEGF em células basais de epitélio escamoso e moderada expressão em estroma subjacente; LSIL com fraca positividade para VEGF no epitélio escamoso e intensa coloração para VEGF em células inflamatórias (seta); HSIL com forte coloração para VEGF em 75% do epitélio escamoso. **Terceira linha:** expressão de c-fms negativa em cérvix normal; LSIL com algumas células epiteliais escamosas positivas para c-fms no citoplasma e alguns núcleos; HSIL com intensa, porém irregular, positividade citoplasmática no epitélio para c-fms. **Quarta linha:** cérvix normal com expressão ausente de COX-2 em epitélio e presente em algumas células estromais (inflamatórias); LSIL com moderada positividade citoplasmática para COX-2 em células epiteliais, além de células glandulares endocervicais normais (setas) também mostrarem reação para COX-2; HSIL francamente positivo para COX-2 com coloração regular no citoplasma. Aumento de 200X.

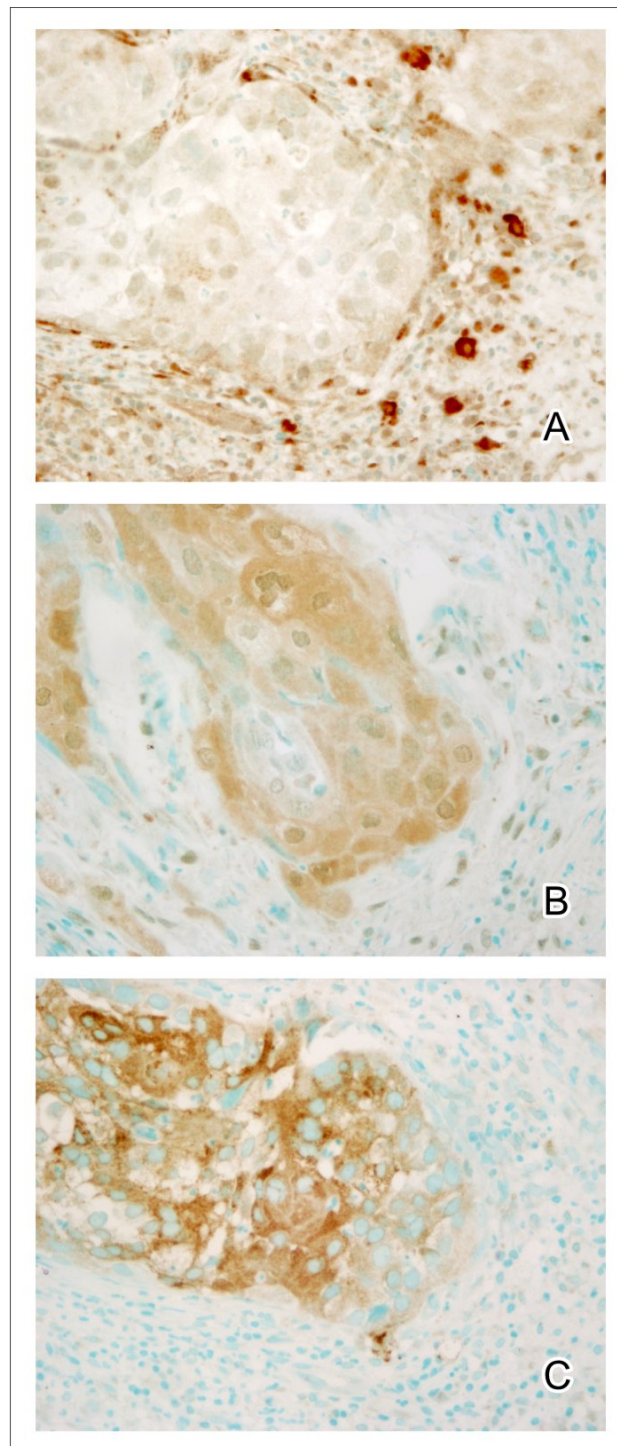


Figura 5. Expressão de VEGF, c-fms e COX-2 em carcinoma cervical invasor e estroma adjacente. A expressão de VEGF (A) é mais intensa no estroma do que em células tumorais, enquanto a expressão de c-fms (B) e COX-2 (C) é praticamente ausente no estroma e fortemente intensa no epitélio. Aumento de 400X.

Para testar a influência de c-fms e COX-2 na expressão de VEGF, procedemos à análise individual de cada categoria de lesão. Isto permitiu que pudéssemos controlar um forte fator de confusão que é próprio grau da lesão, visto que a expressão de VEGF aumentava à medida que as lesões eram mais graves (figura 1). A expressão epitelial de VEGF foi significativamente influenciada por c-fms e por COX-2 em lesões de HSIL e SCC (tabela 1). Por exemplo, em SCC, a expressão de VEGF em regiões COX-2 positivas apresentou mediana de 100 (percentis 25 e 75; 50-150), enquanto nas regiões COX-2 negativas o valor correspondente de VEGF foi 40 (0-100) (Teste de Mann-Whitney U, $P=0,024$). Igualmente, a influência de c-fms em VEGF em casos de SCC pode ser identificada quando comparamos a expressão de VEGF em regiões VEGF+/c-fms+, 100 (70-150), a regiões VEGF+/c-fms-, 10 (0-95,5) (Teste de Mann-Whitney U, $P=0,002$).

Tabela 1. Influência de c-fms e COX-2 na expressão epitelial de VEGF em regiões de cérvix normal, LSIL, HSIL e SCC.

Categoria da lesão	Associação c-fms / VEGF		COX-2 / VEGF	
	Beta padronizado (IC 95%)	<i>P</i>	Beta padronizado (IC 95%)	<i>P</i>
Normal	0,00 (-0,66-0,66)	0,999	0,08 (-0,25-0,52)	0,480
LSIL	-0,01 (-0,39-0,35)	0,932	0,03 (-0,20-0,26)	0,809
HSIL	0,25 (0,06-0,64)	0,020	0,24 (0,02-0,34)	0,027
SCC	0,26 (0,07-0,61)	0,015	0,30 (0,09-0,50)	0,005

Como próximo passo, analisamos o valor de c-fms, COX-2 e VEGF como preditores de HSIL entre as lesões intraepiteliais. Nesta análise, excluimos casos de carcinoma invasor e casos normais, limites do espectro de lesões, que são importantes vieses no cálculo de

risco. Entre casos de lesões intraepiteliais, a expressão de VEGF não foi um fator de risco associado a HSIL, enquanto c-fms (OR=5,56) e COX-2 (OR=6,18) foram estatisticamente considerados preditores (tabela 2).

Tabela 2. Associação da expressão epitelial de VEGF, c-fms e COX-2 nas LSIL como preditoras de HSIL

Marcador		LSIL N (%)	HSIL N (%)	Odds Ratio (IC 95%) de NIC positiva para ser HSIL	<i>P</i> *
VEGF	positivo	11 (40,7%)	16 (59,2%)		
	negativo	17 (54,8%)	14 (45,2%)	1,77 (0,55-5,75)	0,65
c-fms	positivo	3 (31,4%)	12 (68,6%)		
	negativo	25 (54,8%)	18 (26,1%)	5,56 (1,19-29,32)	0,025
COX-2	positivo	11 (20%)	24 (80%)		
	negativo	17 (58,1%)	6 (41,9%)	6,18 (1,67-24,01)	0,004

* Qui-quadrado de Pearson

DISCUSSÃO

VEGF

Nossos resultados demonstram claramente que a expressão de VEGF aumenta em paralelo com a progressão das lesões cervicais, de epitélio normal ao estágio invasor. Adicionalmente, a expressão de VEGF não foi limitada ao epitélio escamoso cervical, já que um nível elevado deste fator foi identificado também no estroma, sugerindo que o tecido adjacente às lesões tem um papel importante no processo de angiogênese. Um achado interessante foi que a expressão de VEGF no estroma de HSIL, mais intensa que a do próprio epitélio, foi comparável à encontrada no estroma de câncer. Isto sugere que o estroma adjacente a HSIL está sendo modificado (preparado) para fornecer abundante vascularização para a invasão celular que ocorrerá quando HSIL progredir para microinvasão.

O forte efeito angiogênico de VEGF também tem sido identificado em vários tumores.^{53,54} Em câncer cervical, está claramente associado a um aumento da densidade vascular na progressão das lesões precursoras.^{6,10,12,13} Além disso, em concordância ao nosso achado de aumento de VEGF também no estroma adjacente às lesões, um estudo prévio evidenciou que o epitélio benigno adjacente a NICs também expressa altos níveis de VEGF.³

C-fms

De acordo com nosso conhecimento, a observação de que a expressão de c-fms aumenta em paralelo à transformação maligna da cérvix foi descrita pela primeira vez neste estudo. Cerca de 70% dos casos de câncer foram positivos para c-fms, com grande contribuição do epitélio e pouca expressão no estroma, enquanto nenhum caso positivo foi identificado em cérvix normal. Embora a expressão estromal de c-fms tenha sido discreta, também apresentou diferença estatística entre os diversos graus de lesões.

Somente um estudo analisou previamente por IHC a expressão de c-fms na cérvix uterina, mas casos de carcinomas invasores não foram incluídos na análise, além dos resultados serem diferentes dos nossos achados: a expressão de c-fms foi descrita como igual em epitélio normal e NIC 3.⁵⁵ Entretanto, similarmente aos nossos resultados, outros estudos com diferentes tumores confirmam o aumento de c-fms de acordo com a gravidade das lesões. Em câncer de bexiga, por exemplo, o percentual de células positivas para c-fms foi descrito como 10,6%, 15,5%, 16,7% e 45,5% para atipia, displasia, carcinoma in situ e carcinoma invasor de células transicionais de bexiga, respectivamente.⁵⁶ Lesões pré-malignas de próstata e mama também mostram níveis de c-fms que aumentam à medida que as lesões progridem para estágios invasores.⁵⁷⁻⁵⁹

CSF-1, o ligante de c-fms, apresenta níveis séricos elevados em pacientes HPV positivas e em pacientes com NIC e, além disso, significativamente mais elevados em pacientes com estágios avançados de câncer invasor quando comparados a estágios iniciais.^{33,34} Flúido peritoneal de pacientes com tumores cervicais extensos também apresentam níveis acentuados de c-fms.³⁶ Adicionalmente, foi demonstrado que células epiteliais de três diferentes linhagens (endocervical, ectocervical e vaginal) quando imortalizadas com

genes E6 e E7 de HPV16 secretam altos níveis de CSF-1 *in vitro*, o que também foi evidenciado *in vivo* em secreções vaginais.³⁵

Por conseguinte, é adequado supor que o proto-oncogene c-fms identificado em nossas amostras está potencialmente ativado já que (a) CSF-1 é detectado em altos níveis em pacientes com câncer cervical por diferentes metodologias, (b) CSF-1 é um fator altamente solúvel que possibilita interações autócrinas, parácrinas e endócrinas entre diferentes compartimentos e (c) linfócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, todos abundantemente encontrados na cérvix uterina, podem produzir este fator.

Além disso, um potencial mecanismo de ativação autócrina causado pela expressão excessiva ou inapropriada de c-fms também tem sido descrita. Por exemplo, a simples expressão aumentada do gene normal de c-fms (clonado num vetor retroviral e transfectado em células que expressam CSF-1 normalmente) é suficiente para induzir um fenótipo totalmente transformado do receptor em fibroblastos e células epiteliais.¹⁶ Ademais, c-fms pode ser convertido para um oncogene ativo por simples mutação randômica, o que é suspeito de acontecer quando sua expressão é elevada, como em nossos casos de câncer cervical.¹⁷

COX-2

Embora COX-2 tenha sido extensivamente estudada em casos de carcinoma cervical invasor, esse é o primeiro relato que demonstra o aumento de COX-2 no processo de malignização utilizando todo o espectro de lesões, de benignas a invasoras. Um total de 100% dos casos de câncer cervical demonstrou positividade para COX-2, em contraste aos dois casos de tecido normal que foram positivos, o que sugere um importante papel

de COX-2 na progressão da carcinogênese cervical. Curiosamente, identificamos uma constante expressão de COX-2 em tecido glandular normal, desde estágios benignos até invasores. Na verdade, COX-2 tem sido descrita como enzima constitutiva de vesículas seminais, cérebro, ovário e de áreas uterinas onde ocorre a implantação do blastocisto.^{48,60}

Em um estudo recente, a expressão de COX-2 foi identificada como aumentada em carcinoma cervical quando comparado a NIC, mas a expressão em NIC foi igual à expressão em casos benignos inflamatórios. Nesse mesmo estudo, casos de NIC foram tratados como uma categoria única, não separados em LSIL e HSIL ou NIC 1, 2 e 3.⁸ Outro estudo incluiu separadamente casos normais, com displasia leve, moderada e severa, encontrando associação de COX-2 e gravidade das lesões, mas não incluiu casos de doença invasora.⁴⁸ Um estudo adicional descreveu que a expressão de COX-2 intensificava-se em carcinoma microinvasor quando comparado a NIC 3, porém não havia casos de lesões de baixo grau e cérvix normal no estudo.⁴⁹ Outros autores também evidenciaram positividade para COX-2 em 12 de 13 casos de tumores cervicais testados, enquanto controles normais eram negativos.⁴⁷ O único estudo que até o momento incluiu todo o espectro de lesões cervicais, diferentemente dos relatos anteriores, concluiu que a expressão de COX-2 não estava significativamente associada com a evolução das lesões.⁵⁰ Em resumo, dos cinco artigos acessados sobre COX-2, quatro demonstraram diferença na expressão de COX-2 comparando pelo menos dois estágios do processo de carcinogênese cervical.

Uma grande quantidade de evidências derivadas de estudos epidemiológicos, estudos *in vitro* e experimentos *in vivo* têm indicado que COX-2 está efetivamente envolvida no processo de carcinogênese em vários tipos de tumores.^{18-25,39} Adicionalmente, dados epidemiológicos demonstram que indivíduos que fazem uso regular de anti-inflamatórios

não esteróides tem risco reduzido de desenvolver câncer colônico e suas lesões precursoras como pólipos adenomatosos.⁶⁰

Influência de c-fms e COX-2 na expressão de VEGF

Apesar do fato de que análise por IHC, por princípio, não é o melhor método para estabelecer uma relação de causa e efeito, nossos resultados sugerem que c-fms possa influenciar positivamente a expressão de VEGF em HSIL e SCC. Provavelmente c-fms não seja um desencadeador do processo inicial de expressão de VEGF, já que não identificamos esta relação em LSILs, mas pode ser um importante contribuidor em lesões de alto grau e estágios invasores. Em estudos de células não tumorais, CSF-1 por meio de c-fms induziu monócitos a produzir e expressar VEGF em maneira dose-dependente e também, via VEGF, aumentou a diferenciação de células da medula óssea em células endoteliais.^{31,32} Em estudos com tumores, o bloqueio da expressão de c-fms em ratos com enxerto de carcinoma mamário suprimiu o crescimento tumoral em 40-50% e estava associado a um importante decréscimo de VEGF e diminuição da atividade angiogênica.¹⁶ Tratamento com CSF-1 também aumentou o número de vasos sanguíneos em tumores de pulmão inoculados em ratos, além de elevar os níveis séricos de VEGF.¹⁷ Entretanto, não existem estudos prévios sobre c-fms e VEGF em câncer cervical que possamos utilizar para comparação. Enfim, de acordo com o conhecimento atual e de acordo com os nossos resultados, sugerimos que c-fms possa induzir a expressão de VEGF durante o processo de carcinogênese cervical, mas maiores estudos são necessários.

COX-2 também foi correlacionada à expressão de VEGF em casos de HSIL e SCC e, em vista disso, as mesmas conclusões de c-fms podem ser tomadas. Tem sido sugerido que COX-2 estimula a produção de VEGF principalmente por meio de prostaglandina E2

(PGE2), um dos mais abundantes prostanóides detectados na maioria dos tumores epiteliais.⁴⁷ Ainda mais, os efeitos dos prostanóides produzidos pela COX-2 na angiogênese podem ser amplificados por uma alça de alimentação retrógrada onde VEGF ativa mutuamente a liberação de ácido-araquidônico pela fosfolipase-A2 e a expressão de COX-2, aumentando a produção de PGE2.^{61,62} Embora extensivamente investigada em outros tumores, a relação entre COX-2 e VEGF na progressão de lesões cervicais foi abordada somente em um estudo (que não incluiu casos de câncer invasor), sugerindo uma correlação tardia entre os dois.⁸ De acordo com nossos resultados, é difícil estabelecer se COX-2 está influenciando c-fms que influencia VEGF ou c-fms influencia COX-2 que age em VEGF ou, outra possibilidade, que ambos COX-2 e c-fms influenciam simultaneamente VEGF.

Uso potencial de COX-2 e c-fms como biomarcadores

Este estudo mostrou que, entre lesões intraepiteliais cervicais, c-fms e COX-2 foram fatores de risco para a lesão ser classificada como HSIL. Uma grande variedade de marcadores moleculares associados à oncogênese de outros tecidos tem sido também investigada na cérvix uterina. O objetivo destes estudos é detectar um marcador precoce de risco de progressão para HSIL e, assim, prevenir tratamentos desnecessários. Um estudo ideal para analisar o valor de cada biomarcador de risco de progressão de LSIL deveria conter casos que LSIL que progrediram para HSIL e casos que não progrediram. Entretanto, como em outros relatos, nosso estudo abordou de maneira diferente este risco, mesmo assim podendo quantificar a importância de cada marcador.^{2,7-10,14,48,50}

Em conclusão, nossos resultados indicam que VEGF, c-fms e COX-2 estão associados com a transformação maligna da cérvix uterina, aumentando à medida que as lesões

tornam-se mais graves. O aumento de VEGF apresentou importante contribuição do estroma subjacente em lesões intraepiteliais. COX-2 e c-fms parecem influenciar a expressão de VEGF tanto em pré-invasivos, quanto em estágios invasores, mas nenhum dos dois foi indispensável para a expressão de VEGF, já que encontramos regiões VEGF positivas que eram inteiramente negativas para estas duas proteínas.

A inibição da angiogênese é uma alternativa atrativa para o tratamento de câncer cervical e sua prevenção em vista de que a neovascularização é um evento intensamente relacionado à progressão de CINs e o endotélio de vasos benignos é usualmente quiescente, sendo pouco afetado por drogas anti-angiogênicas. Uma grande variedade de drogas está sendo desenvolvida e a identificação de novos alvos moleculares na cascata angiogênica da carcinogênese cervical poderá levar a importantes desfechos clínicos em nossas pacientes.

9.2. Versão em inglês

**UP-REGULATION OF VEGF, C-FMS AND COX-2 EXPRESSION ACCOMPANIES
PROGRESSION OF CERVICAL CANCER PRECURSOR (CIN) LESIONS TO INVASIVE
DISEASE**

Luciano S. Hammes^{1 2}, Rajeshwar Rao Tekmal², Paulo Naud¹, Maria Isabel Edelweiss³,
Nameer Kirma², Philip T. Valente⁴, K Syrjänen⁵, João Sabino Cunha-Filho¹.

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Health Science Center at
San Antonio, San Antonio, TX, USA

³ Department of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴ Department of Pathology, University of Texas Health Science Center at San Antonio,
San Antonio, TX, USA

⁵ Department of Oncology & Radiotherapy, Turku University Hospital, Turku, Finland

Correspondence and reprints requests: Luciano S. Hammes, MD, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, TX 78229-3900, USA. Phone: +1. 210.567.4930. FAX: +1.210.567.4958. Email: hammes@cpovo.net

Key words: vascular endothelial growth factor, macrophage colony-stimulating factor receptor, cyclooxygenase-2, immunohistochemistry, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer, disease progression, angiogenesis, biomarker.

Running title: VEGF, c-fms, COX-2 and cervical cancer.

Acknowledgments: This work was supported by grant 0629/05-7 from the Foundation for the Coordination of Higher Education and Graduate Training (CAPES), Brazil, by grant 05-154 from Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Incentive Fund (HCPA-FIPE), Brazil and by Latin American Screening Study, funded by European Commission, INCO-DEV Contract # ICA4-CT-2001-10013. We thank Mr. Gregory A. Langone, Ms. Joanne Click and Ms. Renata Pedrini for the technical assistance. We are also grateful to Prof. Nadine Clausell Ph.D. and Ms. Indara Carmin for the unique support for this project.

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been well described as a potent angiogenic factor but its relationship to other molecular markers - c-fms (proto-oncogene macrophage colony-stimulating factor receptor) and COX-2 (cyclooxygenase 2) - is poorly understood in cervical carcinogenesis.

In this study, biopsies from 26 benign cervix, 28 low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), 30 high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) and 28 squamous cervical carcinomas (SCC) were analyzed by immunohistochemistry (IHC) for VEGF, c-fms and COX-2 expression. For each marker, H-score was calculated and used for analysis at cut-off level of 50 (range 0-300).

Positive epithelial expression in normal cervix, LSIL, HSIL and SCC were, respectively: (a) VEGF - 11.5%, 39.3%, 53.3% and 75% ($P<0.001$); (b) c-fms - 0%, 10.7%, 40% and 67.9%, ($P<0.001$); and (c) COX-2 - 7.7%, 39.3%, 80% and 100%, ($P<0.001$). Stromal VEGF expression was higher than epithelial expression in all CIN grades, with a linear increase to cancer. Stromal c-fms expression was weak, but showed an increasing trend in parallel with disease progression. COX-2 expression in the stroma was weak and did not correlate to lesion grade. VEGF expression was statistically related to c-fms and COX-2 expression in HSIL ($P=0.020$ and $P=0.027$, respectively) and SCC ($P=0.015$ and $P=0.005$, respectively), but co-expression of one or the other was not indispensable for VEGF. When only intraepithelial lesions were counted, expression of c-fms was

associated with HSIL (OR=5.56; 95%CI, 1.19-29.32; $P=0.025$) and COX-2 was also associated with HSIL (6.18;1.67-24.01; $P=0.004$), whereas VEGF expression was not a risk factor for HSIL.

Our data shows that VEGF, c-fms and COX-2 are possible molecular targets for cervical cancer prevention and treatment. VEGF expression had intense stromal expression showing close association to COX-2 and c-fms. C-fms and COX-2 should deserve close attention as potential markers of risk for progressive CIN.

INTRODUCTION

For decades, neovascularization (angiogenesis) associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesions to invasive carcinoma has been described by colposcopy.¹ More recently, microscopic analysis of cervical biopsies has confirmed such an increased angiogenesis during the disease progression from the normal cervix through different grades of CIN to cancer, not only in the lesions but also in their surrounding tissues.^{2,3}

Angiogenesis is an essential step to support cell proliferation, invasion and development of metastasis in cancer. It is agreed that tumor growth is preceded by an increase in vascular supply to feed neoplastic tissue⁴. A variety of pro-angiogenic growth factors are released into the micro-environment by malignant, inflammatory and stromal cells in response to various stimuli.^{4,5} Among others, vascular endothelial growth factor (VEGF) seems to be a potent angiogenic factor in many gynecological tumors, and several studies indicate that VEGF expression closely correlates with the malignant transformation of cervical precancer lesions.^{3,6-14}

In mammalian cells, the VEGF family consists of five members, VEGF-A, B, C, D and placental growth factor (PIGF). In addition, proteins that are structurally related to VEGFs exist in parapoxvirus (VEGF-E) and snake venom (a group of proteins known as VEGF-Fs). VEGF-A is closely related to angiogenesis and vessels maintenance in humans, and

five isoforms have been described VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A189 and VEGF-A206. In this study, we refer to VEGF-A simply as VEGF.^{5,15}

Several factors regulate VEGF expression, including local alterations as hypoxia, oxidative and mechanical stress, glucose deprivation, acidosis, cytokines and oncogenes.

⁵ In tumor tissues, mutation of certain oncogenes and tumor suppressor genes and abnormal production of certain cytokines are frequently related to high VEGF expression and angiogenesis.⁵

Of the factors that influence VEGF expression, the proto-oncogene macrophage colony-stimulating factor receptor (c-fms) and the enzyme cyclooxygenase 2 (COX-2) have been studied in various human tumors, but their expression in cervical cancer and its precursors is incompletely understood.¹⁶⁻²⁵

C-fms was first described as a receptor for differentiation, proliferation and activation of mono-nuclear phagocytes.²⁶ However, abnormal expression of c-fms, with or without its ligand, macrophage colony-stimulating factor (CSF-1), has been documented in a wide variety of epithelial tumors, including carcinomas of breast, ovary, endometrium, lung, kidney, pancreas, and prostate.^{27,28} C-fms is the cellular homologue of the retroviral oncogene v-fms, and its activation triggers multiple signal transduction pathways controlling cell proliferation and differentiation.^{29,30} There is some tentative evidence suggesting that c-fms can induce angiogenesis by stimulating VEGF in both benign and malignant conditions.^{16,17,31,32} Scanty of data on the involvement of CSF-1/c-fms in CIN and cervical cancer are available, and no studies on its interactions with VEGF.³³⁻³⁶

COX-2, an enzyme responsible for the conversion of arachidonic acid to prostaglandin, is undetectable in most normal tissues. However, COX-2 is specifically induced in inflammation and neoplasia, both being conditions associated with angiogenesis. COX-2 also stimulates cell proliferation, resistance to apoptosis and inhibition to immune

surveillance. COX-2 can promote angiogenesis through many pathways: an increase of VEGF production; a stimulation of endothelial cell sprouting, migration, and tube formation by its eicosanoid products; an enhancement of vascular endothelial cell survival by up-regulation of anti-apoptotic proteins; down-regulation of endogenous angiogenesis inhibitors; and an up-regulation of matrix metalloproteinases required for vascular invasion.^{37,38} The close relationship between COX-2 and VEGF has been documented in many tumors, such as bladder, gastric, pancreatic, head and neck, colorectal, lung, ovarian, breast and endometrial cancer.^{18-25,39}

There is some recent evidence implicating that COX-2 is involved also in cervical carcinogenesis, being associated with advanced disease, metastasis and poor prognosis.^{11,40-46} However, the role of COX-2 in CIN lesions has been addressed by few studies only.^{8,47-50} Similarly, reports on the relationship between COX-2 and VEGF in cervical cancer are rare.^{8,11,51,52} Furthermore, reports are even more infrequent about CIN lesions.⁸

The present study objectives to analyze the expression of VEGF, c-fms and COX-2 and their mutual relationships in the different stages of cervical carcinogenesis, from normal cervix to invasive carcinoma, to better understand this process and also to evaluate them as potential markers of risk of disease progression.

MATERIALS AND METHODS

Design and subjects

Routine cervical biopsies from women participated in cervical cancer screening between 2000 and 2003 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, were selected for analysis. Patients were routinely tested for high-risk human papillomavirus (HPV) by Hybrid Capture II (Digene Corporation; Gaithersburg, MD). Material from the normal cervixes was obtained from the women, who were negative for high-risk HPV in this assay. Normal cervix and CIN samples were selected from a cohort of patients screened for cervical cancer - Latin America Screening Study (LAMS Study). Squamous cervical carcinoma samples were selected from archival paraffin blocks, derived from women who were treated during the same period in this same hospital, but not included in the LAMS cohort. All biopsies were fixed in formaldehyde and embedded in paraffin according to routine procedures. Local ethics committee approval was obtained prior to any procedure.

Selection of regions for analysis

Samples were cut at 4 μ m, with the first section stained with H&E to confirm the histological diagnosis accessed by two independent pathologists. The immediately following sections were stained for VEGF, c-fms and COX-2 immunohistochemistry (IHC) at the University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA). From each H&E slide, a mean of three representative areas of the lesion were selected at X200 magnification (blind to IHC results), and marked for subsequent analysis on the IHC

slides. This procedure assured that exactly the same region was read for all different IHC markers.

Lesions were categorized as normal cervix, low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL, equivalent to CIN 1), high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL, which comprises CIN 2 or CIN 3) and squamous cell carcinoma (SCC).

Immunohistochemistry

Slides were dried at 60°C for 20 minutes, de-paraffinized in xylene, re-hydrated through a graded ethanol series and then washed with distilled water. Antigen retrieval for COX-2 was achieved first by boiling the tissues in citrate buffer, pH 6.0, for 20 minutes and then by cooling the slides for 20 minutes. The same procedure was performed to VEGF in 1mM EDTA buffer, pH 8.0. C-fms slides were not submitted to antigen retrieval. Slides were then placed in a semi-automated immunostainer (Sequenza, Thermo Electron Corporation; Waltham, MA, EUA)

IHC was carried out with the avidin-biotin complex (ABC), using LV's Ultravision Kit (Labvision Corporation; Fremont, CA), at room temperature (RT), according to the manufacturer's instructions. Briefly, Hydrogen Peroxide Block was applied for 12 minutes to quench endogenous peroxidase activity followed by Ultra V Block for 5 minutes to block biotin. Slides were incubated with the primary antibody as follows: rabbit monoclonal anti-human VEGF diluted at 1:150 for 40 minutes at RT (reacts with the 121, 165 and 189 amino acid splice variants; cat #RB-9031; Labvision Corporation); rabbit polyclonal anti-human c-fms at 1:50 overnight at 4°C (cat #CBL776; Chemicon International; Temecula, CA); rabbit monoclonal anti-human COX-2 diluted at 1:150 for 30 minutes at RT (cat #RB-9072; Labvision Corporation). Subsequently, biotinylated secondary antibody, goat anti-

rabbit, was applied for 30 minutes followed by streptavidin-peroxidase for 10 minutes. Immunoreactive complexes were detected using diaminobenzidine chromogen exposure for 5 minutes. Finally, slides were counterstained with methyl green for 5 minutes, washed in distilled water, dehydrated in graded ethanol, cleared with xylene and mounted.

Negative controls were concomitantly processed by omitting the primary antibody. External positive controls for VEGF, c-fms and COX-2 were human angiosarcoma, tonsil and colon carcinoma, respectively. Because it was technically not possible to manage all slides at the same time, each IHC batch contained exactly the same proportion of normal, LSIL, HSIL, SCC and negative and positive slides.

Interpretation

IHC images were captured from the areas selected at H&E slides using a Nikon DXM 1200F digital camera microscope with X200 objective lens (Nikon; Melville, NY). The percentages of cytoplasmatic staining in each category (negative, weak, moderate or strong brown staining) were counted and the H-score was obtained using the following formula:

$$\text{H-score} = (\% \text{ cells unstained} \times 0) + (\% \text{ cells stained weak} \times 1) + (\% \text{ cells stained moderate} \times 2) + (\% \text{ cells stained strong} \times 3).$$

The H-scores ranged from 0 (100% negative cells) to 300 (100% strong staining). Epithelial lesions and adjacent stroma were included equally in the picture and the H-scores were obtained separately for each one. An H-score value equal to or greater than 50 was considered positive.

Statistical Analysis

IHC measurements were performed in two different ways: (a) to demonstrate the expression of each marker in normal, LSIL, HSIL and carcinoma lesions, each case being considered as a mean of all regions evaluated; and (b) to show the association between c-fms and VEGF or COX-2 and VEGF, where each region was considered as an individual value in the analysis.

A comparison of mean IHC scores in normal, LSIL, HSIL and SCC was done by the non-parametric Kruskal-Wallis test, and proportions of positive cases were compared by Pearson Chi-Square. Linear regression models using stepwise backward approach were used to test the correlation of c-fms and COX-2 to VEGF expression. Risk was calculated by odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI). In all tests, $P < 0.05$ was considered statistically significant. Because H-score values had a non-normal distribution, they are shown in median, 25th percentile and 75th percentile.

The power analysis done before the study indicated that 28 patients are needed in each category to give a statistical power of 80%, with 95%CI. To confirm that the results were not by chance, we repeated the power analysis using our data and obtained 99.80% power for VEGF and 100% for c-fms and COX-2.

RESULTS

The study comprised 112 patients, including 26 normal, 28 LSIL, 30 HSIL and 28 SCC cases. In total, from these cases, 324 regions were analyzed.

Using immunohistochemistry, in order to examine the expression of VEGF during the process of cervical oncogenesis, we found a direct relationship between the increasing grade of the lesion and VEGF expression in both epithelium and in stroma (figure 1). Normal epithelium, LSIL, HSIL and SCC expressed VEGF in 11.5%, 39.3%, 53.3% and 75% of the cases, respectively ($P<0.001$), while adjacent stroma was positive in 15.4%, 53.6%, 96.7% and 89.3% of the cases, respectively ($P<0.001$).

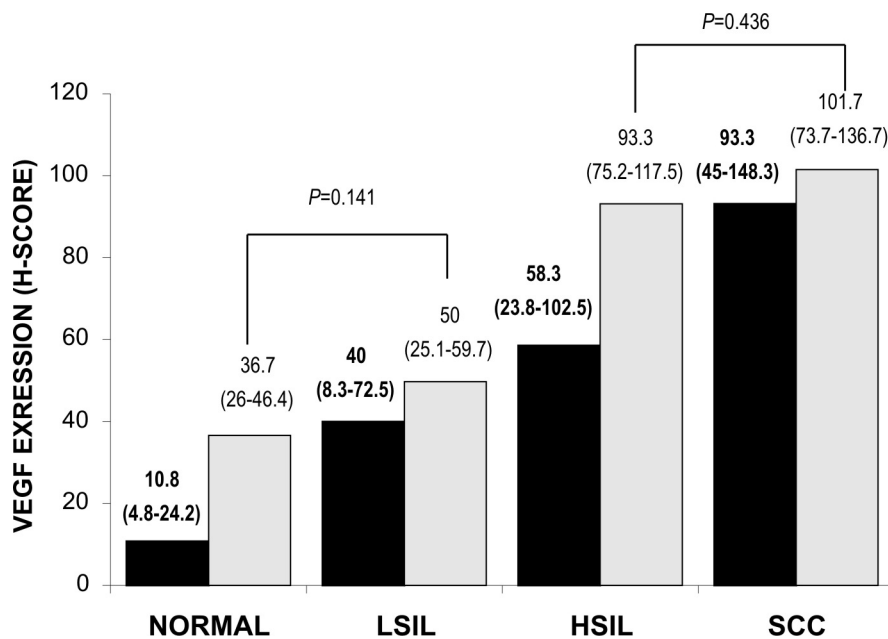


Figure 1. VEGF expression in epithelium (black column) and stroma (gray column) of normal cervix, LSIL, HSIL and SCC cases. VEGF epithelial expression was different between all categories (Kruskal-Wallis test, $P<0.001$). However, in the VEGF stromal expression, there were no differences between normal and LSIL (Mann-Whitney U test, $P=0.141$) and between HSIL and SCC (Mann-Whitney U test, $P=0.436$). All other comparisons in the stroma were statistically different (Kruskal-Wallis test, $P<0.001$). Values presented as median (25th-75th percentile).

We also examined the expression of c-fms along cervix malignization using IHC. Epithelial and stromal c-fms expression demonstrated a direct correlation with the increasing grade of the lesions (figure 2). Expression in the epithelium was notably higher than in the stroma in all categories, except in benign cases (Mann-Whitney U test, $P=0.218$). Normal cervix, LSIL, HSIL and SCC showed epithelial c-fms expression in 0%, 10.7%, 40% and 67.9% of the cases, respectively ($P<0.001$).

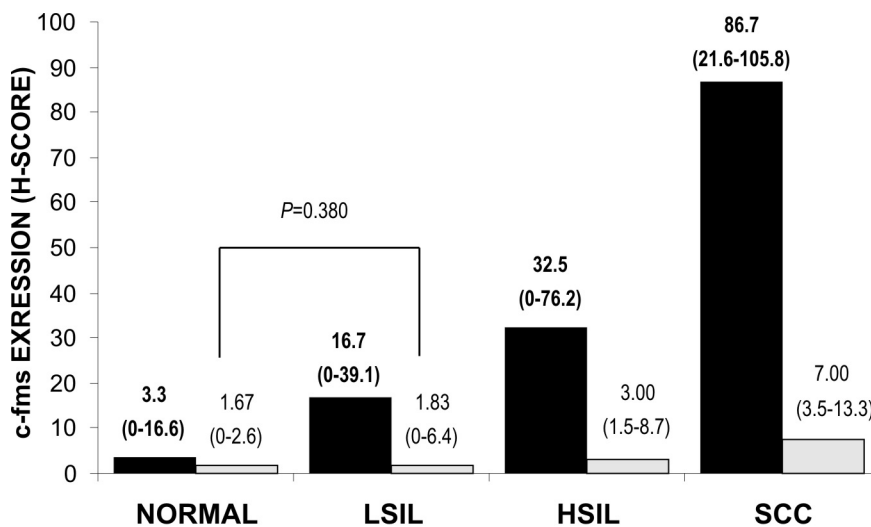


Figure 2. C-fms expression in epithelium (black column) and stroma (gray column) of normal cervix, LSIL, HSIL and SCC cases. C-fms epithelial and expression was different between all categories (Kruskal-Wallis test, $P<0.001$). In stroma, c-fms was not different between normal cervix and LSIL (Mann-Whitney Test, $P=0,380$), but was different between all other categories (Kruskal-Wallis test, $P=0,010$). Values presented in median (25th-75th percentile).

In relation to COX-2, epithelial expression showed a linear increase from normal cervix to SCC, being positive in 7.7%, 39.3%, 80% and 100% of normal cervix, LSIL, HSIL and SCC cases, respectively ($P<0.001$) (figure 3). Such a trend was not identified in the stromal expression, which was different only between normal cervix and HSIL. Interestingly, we found a constant expression of COX-2 by the cervical glandular cells,

from benign to invasive carcinoma, but those data were not included in the analysis (figure 4).

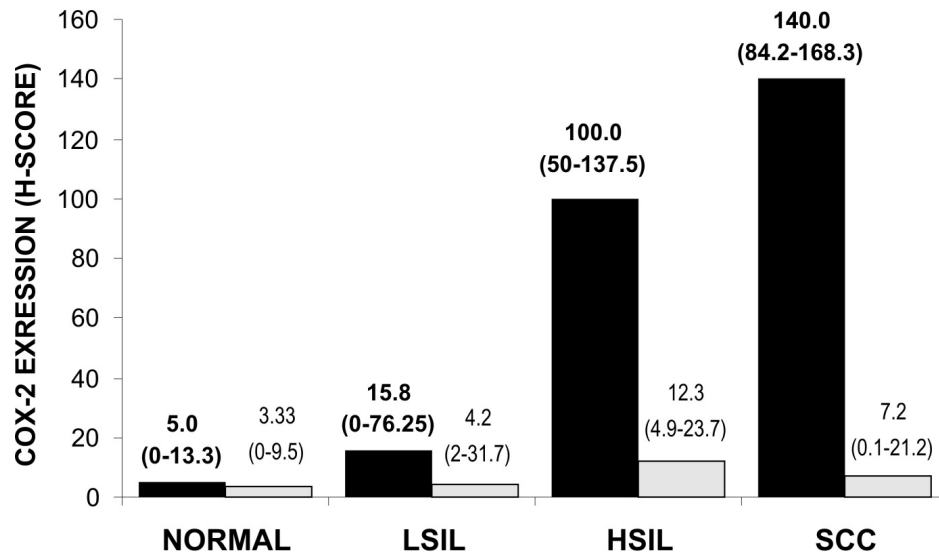


Figure 3. COX-2 expression in epithelium (black column) and stroma (gray column) of normal cervix, LSIL, HSIL and SCC cases. COX-2 epithelial expression was different between all categories (Kruskal-Wallis test, $P < 0.001$) but in the stroma this difference was not identified in all stages (Kruskal-Wallis test, $P < 0.054$). In the stroma, the only difference recognized was between normal and HSIL ($P = 0.003$). Values presented in median (25th-75th percentile).

Figures 4 and 5 present examples of IHC for VEGF, c-fms and COX-2.

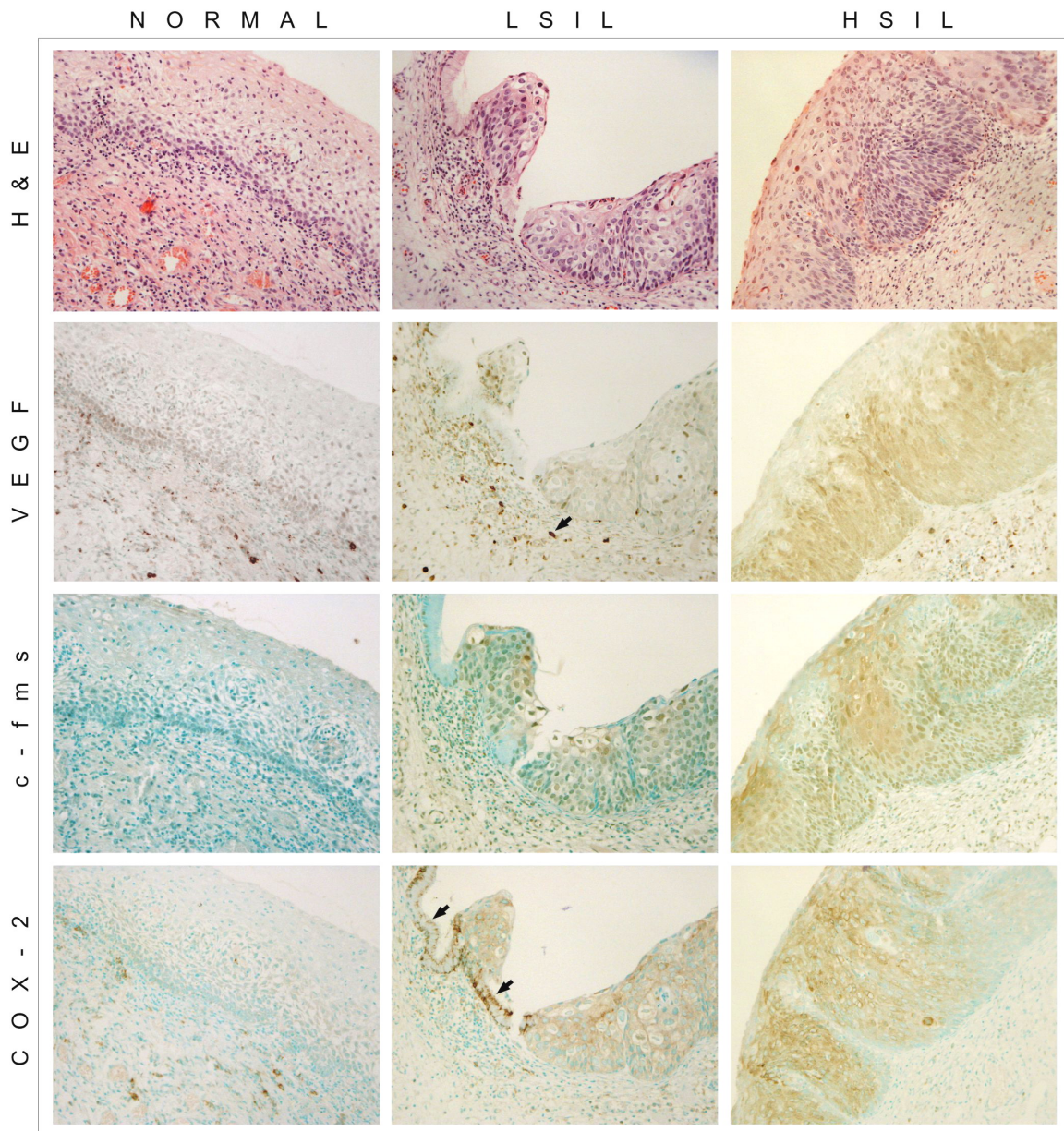


Figure 4. H&E and VEGF, c-fms and COX-2 IHC staining in different stages of cervix malignant transformation. First line: pre-selected H&E representative areas of normal tissue, LSIL, HSIL and SCC. **Second line:** normal cervix with weak VEGF cytoplasmic expression in basal squamous epithelial cells and moderate expression in the stroma; LSIL weakly positivity for VEGF in the squamous epithelium and intense expression in inflammatory cells (arrow); HSIL with intense staining for VEGF in 75% of squamous epithelium. **Third line:** c-fms expression negative in normal cervix,; LSIL showing some squamous epithelial cells with cytoplasmic staining and rare nuclear staining; HSIL highly positive for c-fms at epithelium but irregular. **Fourth line:** normal cervix negative for COX-2 in the epithelium but positive in some stromal cells (inflammatory cells); LSIL showing moderate COX-2 cytoplasmic expression in the dysplastic epithelium and also in the normal glandular epithelium (arrow); HSIL highly positive for COX-2 with regular staining. Magnification X200.

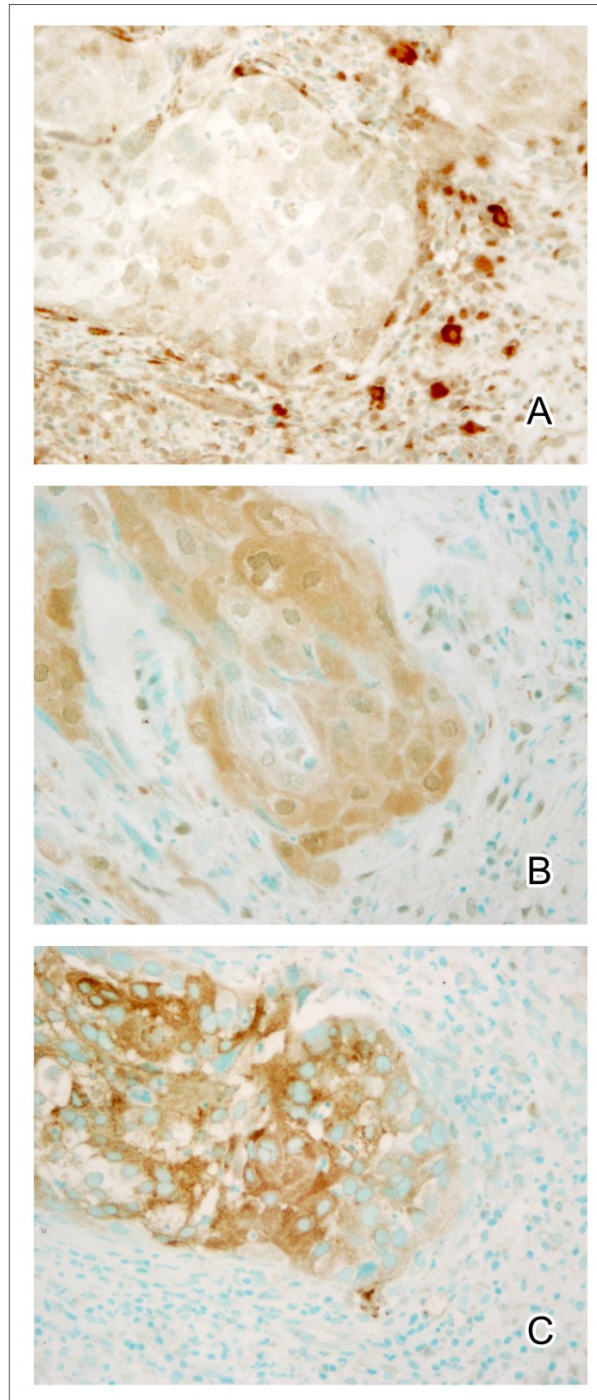


Figure 5. VEGF, c-fms and COX-2 expression in cytoplasm of squamous epithelium and stroma. VEGF (A) stromal expression is higher than tumoral expression, but c-fms (B) and COX-2 (C) is almost undetectable in the stroma and highly positive in the epithelium. Magnification X400.

To test the influence of c-fms and COX-2 on VEGF expression, the analysis was run separately for each stratum to control for the strong confounding of lesion grade on VEGF expression (figure 1). Epithelial VEGF expression was significantly influenced by both c-fms and COX-2 in HSIL and SCC lesions only (table 1). For example, among SCC cases, VEGF expression in COX-2 positive regions had a median of 100 (25-75th percentile; 50-100), while the same value for VEGF at regions COX-2 negative was 40 (0-100) (Mann-Whitney U Test, $P=0.024$). The same figure is identified in SCC cases when we compare VEGF expression in VEGF+/c-fms+ regions, 100 (70-150), to VEGF+/c-fms- regions, 10 (0-95,5) (Mann-Whitney U Test, $P=0.002$).

For example, in SCC, 92% of the regions positive for VEGF were also positive with COX-2 (Pearson Chi Square, $P=0.025$) and 73.0% were positive for c-fms (Pearson Chi Square, $P=0.012$).

Table 1. Influence of c-fms and COX-2 in VEGF epithelial expression in normal cervix, LSIL, HSIL and SCC regions

Lesion grade	Association c-fms / VEGF		COX-2 / VEGF	
	Beta standardized (IC 95%)	P	Beta standardized (IC 95%)	P
Normal	0.00 (-0.66-0.66)	0.999	0.08 (-0.25-0.52)	0.480
LSIL	-0.01 (-0.39-0.35)	0.932	0.03 (-0.20-0.26)	0.809
HSIL	0.25 (0.06-0.64)	0.020	0.24 (0.02-0.34)	0.027
SCC	0.26 (0.07-0.61)	0.015	0.30 (0.09-0.50)	0.005

In the next step, we analysed the value of c-fms, COX-2 and VEGF as a predictor of HSIL, to assess their role in how to predict LSIL that will progress to HSIL and carcinoma. Only CIN lesions were included in this analysis, to exclude the strong bias by the normal cervix

on one hand and cancer on the other hand. Among the CIN lesions, VEGF epithelial expression did not significantly predict HSIL, whereas c-fms (OR=5.56) and COX-2 (OR= 6.18) were significant predictors (table 2).

Table 2. Association of VEGF, c-fms and COX-2 epithelial expression* among LSIL as predictors of HSIL

		LSIL N (%)	HSIL N (%)	Odds Ratio (CI 95%) for a positive case be HSIL among CINs	P*
VEGF	positive	11 (40.7%)	16 (59.2%)	1.77 (0.55-5.75)	0.65
	negative	17 (54.8%)	14 (45.2%)		
c-fms	positive	3 (31.4%)	12 (68.6%)	5.56 (1.19-29.32)	0.025
	negative	25 (54.8%)	18 (26.1%)		
COX-2	positive	11 (20%)	24 (80%)	6.18 (1.67-24.01)	0.004
	negative	17 (58.1%)	6 (41.9%)		

* Pearson Chi-Square test

DISCUSSION

VEGF

Our results show that VEGF expression increases in parallel with the lesion progression from normal epithelium to squamous cell carcinoma. VEGF was not limited to the epithelium, since a high level of this angiogenic factor was identified in the stroma, suggesting that the tissue adjacent to the lesions has an important role in the angiogenic process. Interestingly, VEGF expression in the stroma subjacent to HSIL was much stronger than that in HSIL epithelium, being equal to that found in cancer stroma. This suggests that the stroma in HSIL is being modified (prepared) to provide enough vascularization to the cell invasion that will occur when HSIL progress to microinvasion.

The strong angiogenic effect of VEGF has been recognized in many human tumors.^{53,54} In cervical cancer, it has been clearly associated with an increase in microvessel density (MVD) and with histological grade of CIN. Therefore, VEGF can be considered as a marker of angiogenesis also in the cervix.^{6,10,12,13} In accordance with our demonstration of significantly increased VEGF in the stroma adjacent to the lesions, it has been documented that the surrounding benign epithelium adjacent to CIN also express high levels of VEGF.³

C-fms

To our knowledge, the observation that c-fms expression increases in parallel with the lesion grade in the cervix is described for the first time here. About 70% of cancers were positive to c-fms, while no positive cases were identified among the normal samples. The epithelial compartment expressed much higher levels of c-fms as did the stroma. Although this stromal expression also showed statistically significant difference between the lesion grades, this variation was much less than the increase detected in the epithelium.

Only one study has previously analysed c-fms expression in the cervix, but invasive carcinomas were not included in the analysis, and the results are also different from ours, while reporting equal c-fms expression in normal epithelium and CIN3.⁵⁵ However, similar to our current study, other studies with different tumors have confirmed the up-regulation of c-fms in parallel with the increasing lesion grade. Thus, in bladder carcinoma, the percentage of cells positive for c-fms was 10.6%, 15.5%, 16.7%, and 45.5%, for atypia, dysplasia, carcinoma in situ, and invasive transitional cell carcinoma, respectively.⁵⁶ Prostate and breast pre-malignant lesions also showed c-fms expression that increased as the lesion progressed to invasive carcinoma.⁵⁷⁻⁵⁹

It has been shown that CSF-1, the ligand of c-fms, is elevated in the serum of HPV-positive and CIN patients more often than in healthy controls, and is also significantly elevated in the serum of patients with advanced disease when compared with early stages of cancer.^{33,34} Peritoneal fluids collected from patients with cervical carcinoma also presented high levels of CSF-1.³⁶ Additionally, it has been shown that three HPV16/E6E7 immortalized epithelial cell lines (endocervical, ectocervical and vaginal) secrete high levels of CSF-1, which was detectable also at high concentrations in vivo in genital secretions.³⁵

It is feasible to suppose that c-fms identified in our samples is potentially activated since (a) CSF-1 was highly detected in cervical cancer patients by different approaches, (b) CSF-1 is a soluble factor which allows possible autocrine, paracrine and endocrine interactions between different compartments, and (c) lymphocytes, monocytes, macrophages, fibroblasts and endothelial cells, all abundant in the cervix, can produce this growth factor.

A potential autocrine mechanism of transformation caused by over-expression or inappropriate expression of normal c-fms gene has also been related. Over-expression of normal c-fms gene (cloned into a retroviral vector and transfected into CSF-1-expressing normal cells) can be sufficient to induce a fully transformed phenotype in fibroblast and epithelial cells.¹⁶ Moreover, c-fms can be converted to the active oncogene by random chemical mutagenesis.¹⁷

COX-2

Although COX-2 has been studied extensively in invasive cervical carcinoma, this is the first report detailing COX-2 expression in the full spectrum of cervical lesions and demonstrating that up-regulation of COX-2 expression accompanies the progression of CIN to invasive disease. A total of 100% of cervical cancers showed COX-2 expression in contrast to only two normal samples, which suggests an important role of COX-2 in the progression of cervical carcinogenesis. Curiously, we also consistently found expression of COX-2 in normal cervical glandular cells from benign to carcinoma stages. Actually, COX-2 has been found as a constitutive enzyme in some tissues such as seminal vesicles, brain, ovary, and the uterine area of blastocyst implantation.^{48,60}

In a recent report, COX-2 expression increased in cervical carcinoma when compared to CIN, but CIN expression was not distinguished from inflammatory benign epithelium.⁸ Furthermore, all CIN was treated as an entity, not separated to LSIL and HSIL. Another study included cases classified as normal, mild, moderate and severe dysplasia, and found association of COX-2 and severity of cervical dysplasia, yet cases of cancer were not included.⁴⁸ One additional report described that COX-2 expression increased from CIN 3 to microinvasive carcinoma and further to invasive squamous cell carcinoma, but in that study, LSIL and normal cervix were not investigated.⁴⁹ Additionally, another investigation, by immunoblot, revealed that COX-2 was detected in 12 of 13 cases of cervical cancer but was undetectable in normal cervical tissue.⁴⁷ The only report that included the full spectrum of cervical lesions, differently from the previous studies, concluded that expression of COX-2 was not significantly different across histological strata.⁵⁰ In summary, from the five articles reviewed, four were able to present a difference of COX-2 expression comparing at least two stages of cervical carcinogenesis.

A substantial amount of evidence, derived from epidemiologic studies, in vitro and in vivo experiments, indicates that COX-2 is involved in carcinogenesis.^{18-25,39} In addition, robust epidemiological data showed that individuals who took NSAIDs regularly have a markedly reduced risk of developing colon cancer and its precursor, the adenomatous polyp.⁶⁰

Influence of c-fms and COX-2 on VEGF Expression

Despite the fact that IHC analysis cannot establish a cause-effect relationship, our results suggest that c-fms can positively influence on VEGF expression in HSIL and SCC. Probably c-fms is not a direct trigger of VEGF production but it may be a contributor to high-grade lesions and invasive stages, a conclusion based on the fact that we did not find this influence in LSILs. In non-tumor studies, CSF-1 through c-fms can induce

monocytes to produce and release VEGF in a dose-dependent manner as well as augment the differentiation of bone marrow cells into endothelial cells of blood vessels via VEGF.^{31,32} In studies on tumors, blockage of c-fms in mice with breast cancer xenografts suppressed tumor growth by 40-50% and was associated with decreased VEGF expression and reduced angiogenic activity.¹⁶ CSF-1 also increased vessel density in lung cancer tumors inoculated in mice and, in addition, it elevated the VEGF plasma level.¹⁷ No previous studies are available on cervical cancer about c-fms and VEGF to enable comparison of our findings. Taking this information in account, our data suggest that c-fms may induce VEGF expression in cervical carcinogenesis, although further studies are required to confirm this.

COX-2 influence on VEGF expression was identified also in HSIL and SCC and the same conclusions as for c-fms can be drawn. It has been suggested that COX-2 stimulates VEGF production mainly through the prostaglandin E2 (PGE2) pathway, one of the most abundant prostanoids detected in the majority of epithelial malignancies.⁴⁷ Moreover, the effects of COX-2-induced prostanoids on angiogenesis can probably be amplified via a feedback loop where VEGF activates both phospholipase A2-mediated release of arachidonic acid and COX-2 expression, thereby enhancing PGE2 production.^{61,62} Although extensively investigated in other tumors, the relationship between COX-2 and VEGF in the progression of cervical lesions was analyzed in one study only (not including cancer cases), suggesting a late relationship between these two.⁸ From our study, it is difficult to establish if COX-2 is influencing c-fms and then c-fms influences VEGF or c-fms influences COX-2 that acts on VEGF or, another possibility, COX-2 and c-fms influence simultaneously VEGF.

Potential Use of COX-2 and c-fms as Biomarkers

This study showed that, among intraepithelial lesions, c-fms and COX-2 were considered risk factors for a lesion to be classified as HSIL. A wide variety of molecular markers associated with malignant transformation in other tissues have also been investigated in the cervix. The objective of these studies is to detect an early marker of a risk for progression to HSIL to avoid treatment of LSIL that would likely resolve without intervention. An ideal study to analyze the value of a marker in progression of LSIL would contain cases of LSIL that had progressed to HSIL as well as cases that had not. However, like the majority of other studies, our sample did not include such cases with this follow-up information, but was able to address this risk. ^{2,7-10,14,48,50}

Taken together, our results indicate that VEGF, c-fms and COX-2 are closely associated with the malignant transformation of the cervix, being increased with progressive lesions. Increase of VEGF had an important contribution of the underlying stroma in CIN lesions. COX-2 and c-fms seem to influence on VEGF expression in both pre-invasive and invasive stages, but neither of them was indispensable for VEGF expression, since we found VEGF-positive regions that were entirely negative for those proteins. Angiogenic inhibition is an attractive approach for cervical cancer treatment and prevention, since angiogenesis is an event closely related to progression of CIN, and since the endothelium of healthy blood vessels is usually quiescent. A wide range of drugs are being developed and the identification of new molecular targets in the angiogenic cascade in cervical carcinogenesis could eventually lead to clinically significant results in patients.

9.3. Referências bibliográficas

1. Staffl A, Mattingly RF: Angiogenesis of cervical neoplasia. Am J Obstet Gynecol 1975, 121:845-852
2. Ozalp S, Yalcin OT, Oner U, Tanir HM, Acikalin M, Sarac I: Microvessel density as a prognostic factor in preinvasive and invasive cervical lesions. Eur J Gynaecol Oncol 2003, 24:425-428
3. Smith-McCune KK, Zhu Y, Darragh T: Angiogenesis in histologically benign squamous mucosa is a sensitive marker for nearby cervical intraepithelial neoplasia. Angiogenesis 1998, 2:135-142
4. Gasparini G, Longo R, Toi M, Ferrara N: Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. Nat Clin Pract Oncol 2005, 2:562-577
5. Rasila KK, Burger RA, Smith H, Lee FC, Verschraegen C: Angiogenesis in gynecological oncology-mechanism of tumor progression and therapeutic targets. Int J Gynecol Cancer 2005, 15:710-726
6. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF: Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. J Natl Cancer Inst 1995, 87:1237-1245

7. Soufla G, Sifakis S, Baritaki S, Zafiroopoulos A, Koumantakis E, Spandidos DA: VEGF, FGF2, TGF β 1 and TGF β R1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. *Cancer Lett* 2005, 221:105-118
8. Dai Y, Zhang X, Peng Y, Wang Z: The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005, 97:96-103
9. Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, Baithun S, Beasley N, Thiele W, Weich H, Krishnan J, Shepherd JH, Pepper MS, Jackson DG, Sleeman JP, Jacobs IJ: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol* 2003, 201:544-554
10. Lee JS, Kim HS, Park JT, Lee MC, Park CS: Expression of vascular endothelial growth factor in the progression of cervical neoplasia and its relation to angiogenesis and p53 status. *Anal Quant Cytol Histol* 2003, 25:303-311
11. Kim MH, Seo SS, Song YS, Kang DH, Park IA, Kang SB, Lee HP: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 associated with expression of VEGF in primary cervical cancer and at metastatic lymph nodes. *Gynecol Oncol* 2003, 90:83-90
12. Obermair A, Bancher-Todesca D, Bilgi S, Kaider A, Kohlberger P, Mullauer-Ertl S, Leodolter S, Gitsch G: Correlation of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89:1212-1217
13. Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC: Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1997, 76:1410-1415

14. Branca M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Ciotti M, Benedetto A, Paba P, Costa S, Bonifacio D, Di Bonito P, Accardi L, Favalli C, Syrjanen K: Aberrant expression of VEGF-C is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high risk HPV, but does not predict virus clearance after treatment of CIN or prognosis of cervical cancer. *J Clin Pathol* 2006, 59:40-47
15. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7:359-371
16. Aharinejad S, Paulus P, Sioud M, Hofmann M, Zins K, Schafer R, Stanley ER, Abraham D: Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. *Cancer Res* 2004, 64:5378-5384
17. Okazaki T, Ebihara S, Takahashi H, Asada M, Kanda A, Sasaki H: Macrophage colony-stimulating factor induces vascular endothelial growth factor production in skeletal muscle and promotes tumor angiogenesis. *J Immunol* 2005, 174:7531-7538
18. Lim SC: Role of COX-2, VEGF and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma. *Oncol Rep* 2003, 10:1241-1249
19. Eibl G, Bruemmer D, Okada Y, Duffy JP, Law RE, Reber HA, Hines OJ: PGE(2) is generated by specific COX-2 activity and increases VEGF production in COX-2-expressing human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 306:887-897

20. Ali-Fehmi R, Che M, Khalifeh I, Malone JM, Morris R, Lawrence WD, Munkarah AR: The effect of cyclooxygenase-2 expression on tumor vascularity in advanced stage ovarian serous carcinoma. *Cancer* 2003, 98:1423-1429
21. Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW: COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004, 10:2323-2326
22. Kim HS, Youm HR, Lee JS, Min KW, Chung JH, Park CS: Correlation between cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003, 42:163-170
23. Toyoki H, Fujimoto J, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T: Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in uterine endometrial cancers. *Ann Oncol* 2005, 16:51-55
24. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ: COX-2 expression correlates with VEGF-C and lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2005, 18:153-160
25. Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ: Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003, 37:28-33
26. Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR: Isolation of v-fms and its human cellular homolog. *Virology* 1983, 126:248-258
27. Sapi E, Flick MB, Rodov S, Gilmore-Hebert M, Kelley M, Rockwell S, Kacinski BM: Independent regulation of invasion and anchorage-independent growth by different autophosphorylation sites of the macrophage colony-stimulating factor 1 receptor. *Cancer Res* 1996, 56:5704-5712

28. Sapi E: The role of CSF-1 in normal physiology of mammary gland and breast cancer: an update. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004, 229:1-11
29. Mroczko B, Szmitkowski M: Hematopoietic cytokines as tumor markers. *Clin Chem Lab Med* 2004, 42:1347-1354
30. Kirma N, Luthra R, Jones J, Liu YG, Nair HB, Mandava U, Tekmal RR: Overexpression of the colony-stimulating factor (CSF-1) and/or its receptor c-fms in mammary glands of transgenic mice results in hyperplasia and tumor formation. *Cancer Res* 2004, 64:4162-4170
31. Minamino K, Adachi Y, Okigaki M, Ito H, Togawa Y, Fujita K, Tomita M, Suzuki Y, Zhang Y, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, Matsubara H, Iwasaka T, Matsumura M, Ikehara S: Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), as well as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), accelerates neovascularization. *Stem Cells* 2005, 23:347-354
32. Eubank TD, Galloway M, Montague CM, Waldman WJ, Marsh CB: M-CSF induces vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity from human monocytes. *J Immunol* 2003, 171:2637-2643
33. 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* 1999, 180:28-32
34. Suzuki M, Ohwada M, Sato I, Nagatomo M: Serum level of macrophage colony-stimulating factor as a marker for gynecologic malignancies. *Oncology* 1995, 52:128-133

35. Fichorova RN, Anderson DJ: Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Biol Reprod* 1999, 60:508-514
36. Punnonen R, Teisala K, Kuoppala T, Bennett B, Punnonen J: Cytokine production profiles in the peritoneal fluids of patients with malignant or benign gynecologic tumors. *Cancer* 1998, 83:788-796
37. Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL: Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 2002, 62:625-631
38. Gately S, Li WW: Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 2004, 31:2-11
39. Li G, Yang T, Yan J: Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 299:886-890
40. Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, Lauriola L, Poerio A, Zannoni GF, Smaniotto D, Margariti PA, Macchia G, Scambia G: Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in locally advanced cervical cancer patients undergoing chemoradiation plus surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, 55:21-27
41. Gaffney DK, Holden J, Zempolich K, Murphy KJ, Dicker AP, Dodson M: Elevated COX-2 expression in cervical carcinoma: reduced cause-specific survival and pelvic control. *Am J Clin Oncol* 2001, 24:443-446
42. Ryu HS, Chang KH, Yang HW, Kim MS, Kwon HC, Oh KS: High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion. *Gynecol Oncol* 2000, 76:320-325

43. Distefano M, Ferrandina G, Smaniotto D, Margariti AP, Zannoni G, Macchia G, Manfredi R, Mangiacotti MG, Cellini N, Scambia G: Concomitant radiochemotherapy plus surgery in locally advanced cervical cancer: update of clinical outcome and cyclooxygenase-2 as predictor of treatment susceptibility. *Oncology* 2004, 67:103-111
44. Ferrandina G, Lauriola L, Zannoni GF, Distefano MG, Legge F, Salutari V, Gessi M, Maggiano N, Scambia G, Ranelletti FO: Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in tumour and stroma compartments in cervical cancer: clinical implications. *Br J Cancer* 2002, 87:1145-1152
45. Gaffney DK, Holden J, Davis M, Zempolich K, Murphy KJ, Dodson M: Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, 49:1213-1217
46. Kim YB, Kim GE, Cho NH, Pyo HR, Shim SJ, Chang SK, Park HC, Suh CO, Park TK, Kim BS: Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer* 2002, 95:531-539
47. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001, 7:429-434
48. Farley J, Uyehara C, Hashiro G, Belnap C, Birrer M, Salminen E: Cyclooxygenase-2 expression predicts recurrence of cervical dysplasia following loop electrosurgical excision procedure. *Gynecol Oncol* 2004, 92:596-602

49. Kim JY, Lim SJ, Park K, Lee CM, Kim J: Cyclooxygenase-2 and c-erbB-2 expression in uterine cervical neoplasm assessed using tissue microarrays. *Gynecol Oncol* 2005, 97:337-341
50. Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, De Angelo Andrade LA: Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecol Oncol* 2006
51. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, Hammond E, Seaman J, Holden J, Lee RJ, Zempolich K, Dodson M: Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, 56:922-928
52. Lee JS, Choi YD, Lee JH, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Kim HS, Min KW: Expression of cyclooxygenase-2 in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and tumor growth. *Gynecol Oncol* 2004, 95:523-529
53. Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther* 2005, 4:315-321
54. Graca B, Lunet C, Coelho AS, Monteiro G, Freire P, Speidel A, Carvalho L: [Angiogenesis and cancer: from biopathology to therapy]. *Acta Med Port* 2004, 17:76-93

55. Ngan HY, Liu SS, Yu H, Liu KL, Cheung AN: Proto-oncogenes and p53 protein expression in normal cervical stratified squamous epithelium and cervical intra-epithelial neoplasia. *Eur J Cancer* 1999, 35:1546-1550
56. Kee KH, Lee MJ, Ro JY: Oncoprotein changes in the flat lesions with atypia and invasive neoplasms of the urinary bladder. *Oncol Rep* 2001, 8:579-583
57. Ide H, Seligson DB, Memarzadeh S, Xin L, Horvath S, Dubey P, Flick MB, Kacinski BM, Palotie A, Witte ON: Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:14404-14409
58. Tang R, Beuvon F, Ojeda M, Mosseri V, Pouillart P, Scholl S: M-CSF (monocyte colony stimulating factor) and M-CSF receptor expression by breast tumour cells: M-CSF mediated recruitment of tumour infiltrating monocytes? *J Cell Biochem* 1992, 50:350-356
59. Flick MB, Sapi E, Perrotta PL, Maher MG, Halaban R, Carter D, Kacinski BM: Recognition of activated CSF-1 receptor in breast carcinomas by a tyrosine 723 phosphospecific antibody. *Oncogene* 1997, 14:2553-2561
60. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM, Blanke C: Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective - Role of COX-2 inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett* 2004, 215:1-20
61. Tamura M, Sebastian S, Gurates B, Yang S, Fang Z, Bulun SE: Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87:3504-3507

62. Iniguez MA, Rodriguez A, Volpert OV, Fresno M, Redondo JM: Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* 2003, 9:73-78

10. ARTIGO CIENTÍFICO 3

10.1. Versão em português

**MACRÓFAGOS, INFLAMAÇÃO E RISCO DE PROGRESSÃO DE NEOPLASIA
INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC) – CORRELAÇÃO CLINICO-PATOLÓGICA**

Luciano S. Hammes^{1,2}, Rajeshwar Rao Tekmal², Paulo Naud¹, Maria Isabel Edelweiss³,
Philip T. Valente⁴, Nameer Kirma², K Syrjänen⁵, João Sabino Cunha-Filho¹.

¹ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Centro de Ciências da Saúde da
Universidade do Texas em San Antonio, San Antonio, Texas, Estados Unidos

³ Departamento de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

⁴ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas
em San Antonio, San Antonio, Texas, Estados Unidos

⁵ Departamento de Oncologia e Radioterapia, Hospital Universitário de Turku, Finlândia

Correspondências e solicitação de cópias: Dr. Luciano S. Hammes, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas em San Antonio, San Antonio, Texas, Estados Unidos. End: 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, TX 78229-3900, USA. Telefone: +1. 210.567.4930. Fax: +1.210.567.4958. E-mail: hammes@cpovo.net.

Palavras-chave: macrófagos, monócitos, proteína CD68, imunohistoquímica, inflamação, neoplasia intraepitelial cervical, câncer cervical, progressão de doença, biomarcador

Título resumido: macrófagos, inflamação e NIC

Agradecimentos: Este trabalho foi apoiado pelo contrato 0629/05-7 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pelo contrato 05-154 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Fundo de Incentivo à Pesquisa (HCPA-FIPE), Brasil, e pelo Estudo Latinoamericano de Rastreamento (*Latin America Screening Study – LAMS Study*) da Comunidade Econômica Européia (INCO-DEV ICA4-CT-2001-10013). Agradecemos Sr. Gregory A. Langone, Sra. Joanne Click e Srta. Renata Pedrini pela ajuda técnica. Também somos gratos à Prof^a. Nadine Clausell Ph.D. e Sra. Indara Carmin pelo apoio a este estudo.

RESUMO

Aumento do número de macrófagos têm sido associados a um pior prognóstico e severidade de lesões em inúmeros tipos de tumores malignos. Entretanto, o entendimento da influência da população de macrófagos em desfecho clínico das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) é restrito.

Com o objetivo de avaliar esta relação, biópsias de 26 cérvices normais, 28 lesões escamosas intraepiteliais cervicais de baixo grau (*low-grade squamous intraepithelial lesion*, LSIL), 30 lesões escamosas intraepiteliais cervicais de alto grau (*high-grade squamous intraepithelial lesion*, HSIL) e 28 carcinomas de células escamosas (*squamous cell carcinoma*, SCC) foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação de inflamação e por imunohistoquímica (IHC) com anti-CD68 para detecção de macrófagos. A contagem de macrófagos foi corrigida proporcionalmente para a área de epitélio e estroma com uso de software apropriado. Informações prospectivas das pacientes com biópsias normais, LSIL e HSIL eram disponíveis, incluindo testagem para papilomavírus humano (HPV) de alto risco por Captura Híbrida 2.

Identificou-se que a contagem de macrófagos aumentou linearmente com a progressão da doença (contagem por caso – mediana: cérvice normal, 5,1; LSIL, 5,5; HSIL, 9,9; SCC, 14,5; $P < 0,001$). A reação inflamatória também aumentou de acordo com a gravidade das lesões (inflamação moderada a intensa presente em 25%, 46,1%, 58,4% e 89,3% de amostras normais, LSIL, HSIL e SCC, respectivamente; $P < 0,001$), sendo que a

contagem de macrófagos apresentou forte correlação com a inflamação. Entretanto, mesmo quando controlada para inflamação, a distribuição de macrófagos ainda estava associada ao grau da lesão ($P < 0,001$). Adicionalmente, identificou-se migração dos macrófagos para o epitélio escamoso à medida que aumentava a gravidade da lesão. Das LSIL com informações disponíveis, acompanhadas por 805 ± 140 dias, 16 regrediram, 6 persistiram (por 512 ± 140 dias em média) e duas progrediram. Idade, presença de HPV de alto risco ou inflamação não foram fatores de risco para persistência/progressão das LSIL, entretanto, lesões que persistiram ou progrediram mostraram uma maior contagem de macrófagos [mediana (percentil 25-75)], 10,8 (5-16,2) do que lesões que regrediram, 7 (2,7-9,1) ($P = 0,031$).

Conclui-se que existe uma inequívoca associação do sistema imunológico, neste caso o número de macrófagos, e a progressão de lesões intraepiteliais cervicais. Além disto, o estudo de macrófagos oferece um potencial alvo para o tratamento de câncer de colo uterino, já que estavam intimamente correlacionados com o grau das lesões e podem, também, ser utilizados como um marcador de risco de progressão de NIC.

INTRODUÇÃO

Tumores malignos são estruturas complexas que necessitam interagir com o ambiente que os cerca para promover crescimento e invasão. Como objetivo final desta interação, o tumor busca promover aporte vascular adequado, bloqueio de sinais de crescimento negativos, exacerbação de sinais de crescimento positivos, resistência à apoptose e capacidade de replicação ilimitada.¹⁻³

Dados convincentes têm sido descritos nos últimos anos indicando que a inflamação tem papel importante neste processo. Estudos epidemiológicos mostram que o uso de drogas antiinflamatórias está associado a um risco reduzido de câncer e lesões pré-malignas.⁴ Entre as células inflamatórias, os macrófagos associados a tumores (*tumor associated macrophages*, TAM) são indicados como importantes componentes da inflamação, não só em número, mas também em relação às suas funções.^{2,5}

Macrófagos são derivados de monócitos produzidos na medula óssea que adotam diferentes fenótipos quando entram na circulação sanguínea. Quando alcançam os tecidos, os monócitos originam uma variedade de células dendríticas (chamadas de células de Langerhans na epiderme), macrófagos e osteoclastos. As células de Langerhans (LC) são monócitos denominados “residentes” pois já habitam os tecidos regularmente, constituindo a primeira barreira imunológica contra patógenos e insultos teciduais. Os macrófagos, por conseguinte, migram posteriormente para o local do insulto

estimulados pela reação inflamatória, sendo assim chamados de monócitos “inflamatórios”.⁶⁻⁸

Em condições benignas, os macrófagos protegem o organismo de infecções bacterianas, remodelam os tecidos e reparam danos tissulares, assim funcionando como um componente essencial do sistema imune inato. Macrófagos são capazes de secretar uma grande variedade de citocinas, fatores de crescimento, lisozimas, proteases, complementos, fatores de coagulação e prostaglandinas.^{1,3} Entretanto, na presença de tumores, os macrófagos podem assumir um fenótipo completamente diferente e contribuir para o crescimento tumoral, invasão, metástases, angiogênese e regulação imune local.⁵

Em inúmeros tipos de tumores malignos, o acúmulo de macrófagos, que às vezes é o principal componente do infiltrado inflamatório, está associado a um pior prognóstico como, por exemplo, câncer de mama e ovário.⁵

Alguns dos quimioatrativos produzidos pelas células tumorais cervicais, como proteína quimioatrativa para monócitos-1 (*monocyte chemotactic protein 1*, CCL2), fator estimulador de colônia de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*, CSF-1) e fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), também são identificados na corrente sanguínea, sugerindo uma ação sistêmica.⁹⁻¹⁷ Por exemplo, níveis séricos de CSF-1 foram identificados como elevados em pacientes com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e até mesmo em pacientes que apresentavam simples infecção pelo papilomavírus humano (HPV), quando comparadas a controles saudáveis.¹² Entretanto, as informações disponíveis sobre o papel dos macrófagos na carcinogênese cervical são conflitantes. Alguns autores têm demonstrado que a população de macrófagos aumenta à medida que NIC progride para carcinoma de células escamosas (*squamous cell carcinoma*, SCC), mas análises de prognóstico e correlação com presença de HPV são raramente encontradas.¹⁸⁻²⁴ Contrariamente, outros autores

sugerem que a população de macrófagos decresce em NIC quando comparada a cérvix normal, atribuindo esta redução à presença dos oncogenes virais E6 e E7 do HPV.²⁵⁻²⁹

Para o esclarecimento desta questão, a associação de macrófagos a lesões precursoras de câncer de colo uterino e risco de progressão, realizou-se no estudo a seguir uma análise cuidadosa da reação inflamatória e da população de macrófagos em amostras de cérvix normal, NIC e SCC, utilizando-se coloração de hematoxilina e eosina (H&E) e imunohistoquímica (IHC) com anticorpo anti-CD68.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento e seleção das amostras

Biópsias realizadas em mulheres rastreadas para câncer cervical entre 2000 e 2003 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil, foram selecionadas para análise. As amostras foram categorizadas em cérvix normal, lesões escamosas intraepiteliais cervicais de baixo grau (*low-grade squamous intraepithelial lesion*, LSIL, equivalente a NIC 1), lesões escamosas intraepiteliais cervicais de alto grau (*high-grade squamous intraepithelial lesion*, HSIL, equivalente a NIC 2 e 3) e SCC.

Amostras de cérvix normal e NIC foram provenientes de uma coorte de pacientes rastreadas para câncer de colo uterino por citologia convencional (exame de Papanicolau), inspeção visual com ácido acético (VIA) e com lugol (VILI), testagem para HPV de alto risco e, quando necessário, colposcopia e biópsia. Esta coorte faz parte do Estudo Latino-americano de Rastreamento (*Latin America Screening Study – LAMS Study*).

As biópsias eram realizadas com intenção de diagnóstico e não excisão, preservando as lesões na cérvix uterina. Pacientes com LSIL foram seguidas com consultas a cada 6 meses. Para a análise de desfecho de LSIL, consideramos: a) progressão, quando LSIL torna-se subseqüentemente NIC 2, 3 ou SCC, comprovado por biópsia); b) persistência, quando LSIL persiste com o mesmo diagnóstico histológico por mais de 330 dias (segunda biópsia era necessária para confirmar diagnóstico); e c) regressão, quando a

lesão previamente diagnosticada não era mais visível na cérvix ou, mesmo com alterações colposcópicas, a biópsia subsequente na mesma região não mostrava mais lesão. Para assegurar que amostras histológicas benignas eram de fato normais, somente amostras de pacientes negativas para HPV de alto risco foram incluídas na categoria normal.

Carcinoma invasores foram selecionados de blocos de parafina de biópsias de pacientes tratadas no mesmo período, no mesmo hospital, mas que não faziam parte da coorte do estudo LAMS. Todas as biópsias foram fixadas em formaldeído e embebidas em parafina de acordo com a rotina do laboratório. A aprovação do Comitê de Ética local foi obtida antes de qualquer procedimento.

Seleção das regiões para análise

As amostras foram seccionadas com espessura de 4 μ m, sendo o primeiro corte corado em H&E para confirmação do diagnóstico histológico por dois patologistas independentes. Em cada lâmina corada por H&E, três regiões representativas em média eram demarcadas sob microscopia, aumento de 200X, sem conhecimento dos resultados de IHC, para posterior análise nas lâminas de IHC. Esse procedimento assegurava que exatamente a mesma região seria interpretada em H&E e IHC, e que regiões realmente com lesões seria avaliadas.

Testagem para HPV

A detecção de HPV foi realizada pelo exame de Captura Híbrida 2 (HCII – Digene Corporation; Gaithersburg, MD, EUA) utilizando-se amostras cervicais coletadas

imediatamente antes das biópsias. As amostras foram analisadas pelo sistema automatizado de HCII para a presença de HPV de alto risco, subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, de acordo com protocolo do fabricante. Para cada espécime, valores de RLU/CO foram calculados como a razão da luminescência da amostra em teste (ratio of specimen luminescence – RLU) pela luminescência padrão de 1.0pg/ml de HPV16 (cutoff Standard – CO; 100.000 genomas/ml de HPV16) e valores iguais ou maiores que 1 RLU/CO foram considerados positivos.

Imunohistoquímica

Para proceder-se à IHC, as lâminas foram secadas a 60°C por 20 minutos, desparafinizadas em xilol, reidratadas através de vários gradientes de álcool e finalmente lavadas com água destilada. Recuperação dos epítomos para CD68 foi obtido fervendo-se as lâminas em solução tampão de citrato, pH 6.0, por 20 minutos e esfriando-as por mais 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram dispostas em bandejas semi-automáticas para realização de IHC. (Sequenza, Thermo Electron Corporation; Waltham, MA, EUA).

IHC foi realizada pela reação do complexo de avidina-biotina (ABC), utilizando-se reagentes LV's Ultravision (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), em temperatura ambiente (TA), de acordo com as orientações do fabricante. Bloqueador de peróxido de hidrogênio foi aplicado por 12 minutos, seguido por bloqueador Ultra-V por 5 minutos para bloqueio de biotina. As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário: anticorpo monoclonal de rato anti-CD68 humano, diluído na proporção de 1:100, por 30 minutos em TA (cat. #MS-1808-S; Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA). CD68 é uma glicoproteína transmembrana altamente expressada em macrófagos e suas formas jovens, monócitos precursores, e raramente expressada por LC. Assim, nesse estudo,

macrófagos adultos e formas jovens positivos para CD68 (CD68+) serão referidos apenas como macrófagos.⁶

Posteriormente, anticorpo secundário ligado à biotina foi aplicado por 30 minutos, sendo seguido por estreptavidina-peroxidase por 10 minutos. Finalmente, a reação foi revelada com a aplicação do cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. Como passo final, as lâminas foram contracoradas com verde de metila por 5 minutos, lavadas em água destilada, desidratadas em gradientes de álcool e protegidas com lamínula.

Controles negativos foram processados concomitantemente omitindo-se o anticorpo primário. Controles positivos externos foram obtidos de amostras de amígdala. Em vista de ser tecnicamente impossível manejar todas as lâminas ao mesmo tempo, cada procedimento de IHC continha a mesma proporção de amostras normais, LSIL, HSIL, SCC e controles negativos e positivos.

Interpretação

As regiões previamente selecionadas na coloração H&E foram fotografadas nas lâminas de H&E e IHC utilizando-se microscópio com câmera digital Nikon DXM 1200F(Nikon; Melville, NY, EUA), magnificação de 200X, arquivadas e processadas em computador sistema Windows. Cada campo microscópico representa uma área de 0.28 mm².

A intensidade da inflamação identificada no estroma foi avaliada nas imagens da coloração H&E utilizando-se quatro categorias: 0, sem inflamação; 1, inflamação leve; 2, inflamação moderada; 3, inflamação intensa.

Para a interpretação de IHC, as imagens foram processadas pelo software Corel Photo Paint X3 (Corel Corporation; Eden Prairie, MN, EUA) com a marcação manual de cada

célula CD68+. O uso de imagens digitais proporcionava a utilização de um aumento adicional ao aumento obtido com o microscópio, quando necessário, para observação de detalhes. Células CD68+ com núcleo completamente ou parcialmente visível foram contadas, enquanto debris CD68+, e.g. fragmento de membrana, não foram considerados na contagem.

Adicionalmente, as áreas dos compartimentos de epitélio e estroma foram separadamente medidas com Corel Draw X3 (Corel Corporation; Éden Prairie, MN, EUA) e o número de macrófagos foi corrigido proporcionalmente para estas áreas, utilizando-se as seguintes fórmulas: a) contagem final de macrófagos no estroma = (número de macrófagos no estroma x 100) / percentual do estroma na imagem; b) contagem final de macrófagos no epitélio = (número de macrófagos no epitélio x 100) / percentual de epitélio na imagem. Para a contagem total de macrófagos, os valores corrigidos obtidos no epitélio e estroma foram somados e divididos por dois.

Análise Estatística

Os valores da IHC foram avaliados de duas maneiras: (a) para demonstrar a presença de macrófagos CD68+ em tecido normal, LSIL, HSIL e SCC, cada caso foi considerado uma média de todas as regiões analisadas; e (b) para avaliar a associação entre inflamação e macrófagos e para avaliar o risco de progressão, cada região foi considerada como um valor individual na análise.

Em vista dos valores obtidos na contagem de macrófagos apresentarem distribuição assimétrica, eles são apresentados em mediana e percentis 25 e 75. Valores com distribuição normal são apresentados em média \pm desvio-padrão (DP). Comparação das populações de macrófagos em cada grau de lesão foi realizada utilizando-se o teste não-

paramétrico Kruskal-Wallis e comparação das proporções, com Qui-quadrado de Pearson. Médias das variáveis com distribuição normal foram comparadas pelo Teste t de Student. Em todos os testes, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A análise de poder indicava que, para detectar uma diferença de 10 na contagem de macrófagos entre cada grau de lesão com poder de 80% e nível significância de 5%, uma amostra de 27 casos seria necessária em cada grupo.

RESULTADOS

A avaliação dos macrófagos foi realizada pela análise de sua população em lesões pré-cancerosas (LSIL e HSIL) e carcinomas comparada à cérvix normal. O estudo incluiu 112 pacientes distribuídas em 26 casos normais, 28 LSIL, 30 HSIL e 28 SCC. Ao total, destes casos, 324 diferentes regiões foram analisadas.

Identificou-se claramente uma relação direta entre a gravidade das lesões cervicais e o aumento no número de macrófagos no epitélio, estroma e contagem total de macrófagos (epitélio e estroma considerados conjuntamente) (figura 1).

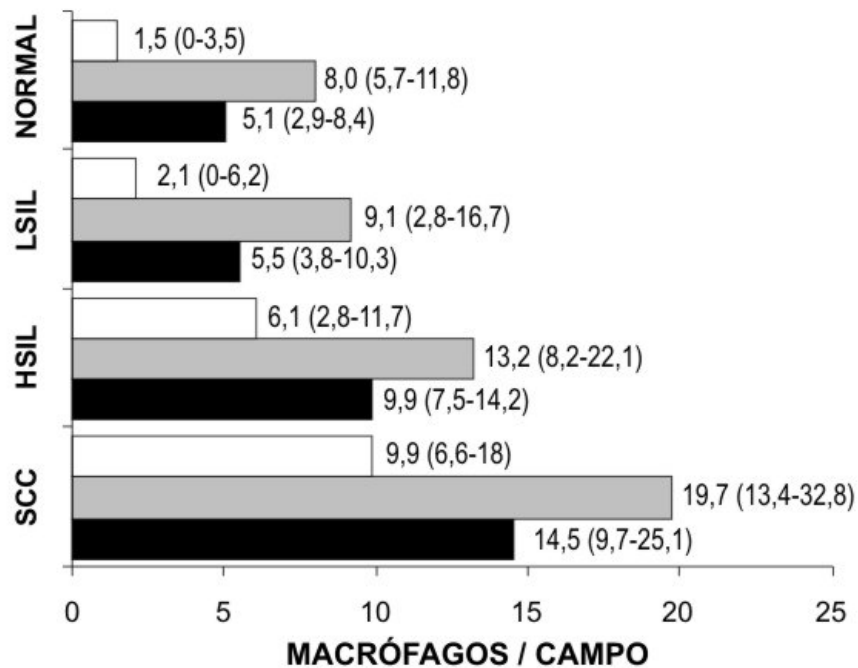


Figura 1. Contagem de macrófagos (por campo de 200X) no epitélio (barras brancas), estroma (barras cinzas) e ambos compartimentos combinados (barras pretas) em diferentes lesões cervicais. A contagem de macrófagos não foi diferente entre cérvix normal e LSIL (Teste de Mann-Whitney U) tanto em estroma ($P=0,653$), epitélio ($P=0,119$) e valores combinados ($P=0,328$). Entretanto, em todas as outras comparações houve diferença estatística (Teste de Kruskal-Wallis): epitélio, ($P<0,001$), estroma ($P<0,001$) e combinados ($P<0,001$). Valores apresentados em mediana (percentis 25-75).

O compartimento estromal consistentemente apresentou maiores contagens de macrófagos que o epitélio. Entretanto, esta diferença diminuiu proporcionalmente à medida que as lesões progrediam, indicando um influxo de macrófagos do estroma para o epitélio. O percentual de macrófagos que infiltravam o epitélio foi de [mediana (percentil 25-75)] 0% (0%-26,7%), 13,5% (0%-45%), 25% (7,1%-48,3%) e 31,3% (18,3%-47,1%) da contagem total de macrófagos em amostras normais, LSIL, HSIL e SCC, respectivamente ($P<0.001$).

A intensidade da reação inflamatória também estava intimamente associada com o grau da lesão (tabela 1). Por exemplo, utilizando-se o ponto de corte de inflamação negativa-fracas e moderada-intensa, casos normais, LSIL, HSIL e SCC eram positivos para inflamação em 25%, 46,1%, 58,4% e 89,3% das regiões analisadas, respectivamente ($P<0,001$).

Tabela 1. Relação de inflamação e grau da lesão cervical

Grau da lesão	INTENSIDADE DA INFLAMAÇÃO							
	Negativa		Fracas		Moderada		Intensa	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Normal	18	23,7	39	51,3	14	18,4	5	6,6
LSIL	7	9,3	33	44	16	21,3	19	25,3
HSIL	8	9	29	32,6	32	36	20	22,5
SCC	0	0	9	10,7	27	32,1	48	57,1
Total (N=324)	33	10,2	110	34,0	89	27,5	92	28,4

Qui-quadrado de Pearson, $P<0,001$; N, número de regiões analisadas

Utilizando-se ponto de corte inflamação negativa-fracas e moderada-intensa, os macrófagos eram consistentemente mais freqüentes em regiões inflamatórias de casos normais, LSIL, HSIL e SCC (tabela 2). Independentemente da densidade da reação

inflamatória, a contagem de macrófagos ainda era consistentemente associada ao grau da lesão, como pode ser evidenciado na tabela 2. Tanto no grupo de regiões com inflamação negativa-fraca, quanto no grupo com inflamação moderada-forte, a população de macrófagos aumentou com a progressão da doença.

Tabela 2. Inflamação e número total de macrófagos em diferentes lesões cervicais

Grau da lesão	NÚMERO TOTAL DE MACRÓFAGOS *				P †
	Inflamação negativa-fraca		Inflamação moderada-intensa		
Normal	4,00	(2,04-6,46)	6,90	(3-11,25)	0,041
LSIL	4,58	(2-7,38)	7,78	(5-16,25)	0,001
HSIL	8,00	(5-12,69)	12,05	(8,14-16,56)	0,003
SCC	8,75	(5,46-12,29)	16,27	(8,75-24,96)	0,044
P ‡	<0.001		<0.001		

* por campo de magnificação 200X, valores em mediana (percentis 25-75)

† Teste de Mann-Whitney U para comparação da contagem de macrófagos entre inflamação negativa-fraca e moderada-intensa

‡ Teste de Kruskal-Wallis para comparação da contagem de macrófagos entre diferentes graus de lesões, controlando para inflamação

Os resultados da testagem para HPV de alto risco foram disponíveis para 26 casos normais, 23 LSIL e 30 HSIL com 0%, 78,3% e 93,3% de resultados positivos (Qui-quadrado Pearson, $p < 0,001$). A contagem de macrófagos entre casos HPV de alto risco positivo ou negativo, estratificada por grau de lesões, não foi diferente entre os dois grupos.

Finalmente, analisamos a correlação da população de macrófagos e desfecho clínico (persistência-progressão) de LSIL, baseado no seguimento de 24 pacientes com LSIL (média de idade de $32,9 \pm 7,5$ anos), seguidas por 805 ± 140 dias. Um total de 16

pacientes (66,7%) apresentou regressão das lesões durante o tempo de seguimento, 6 (25%) mostraram persistência das lesões (por uma média de 512 ± 140 dias) e 2 (8,3%) progrediram para HSIL/carcinoma. Em um modelo de regressão linear, a idade da pacientes, prevalência de HPV de alto risco ou inflamação não foram considerados fatores de risco para persistência/progressão das lesões, mas a contagem de macrófagos em LSIL foi estatisticamente um fator que influenciou este desfecho. A contagem de macrófagos foi estatisticamente maior em lesões LSIL que persistiram/progrediram quando comparada a lesões que regrediram. (tabela 3).

Tabela 3. Risco de progressão de LSIL de acordo com idade, presença de HPV e número total de macrófagos.

Fator de risco	LSIL		<i>P</i>
	regressão (N=16 casos; 42 regiões)	persistência-progressão (N=8 casos; 22 regiões)	
Idade (anos; média \pm DP)	30,5 \pm 7,9	34,1 \pm 7,2	0,599*
Teste positivo para HPV alto risco	62,5%	80%	0,363†
Inflamação moderada-intensa	47,6%	40,9%	0,609†
Macrófagos (mediana; percentis 25-75)	7 (2,7-9,1)	10,8 (5-16,2)	0,031‡

* Teste t de Student; † Teste Qui-quadrado de Pearson; ‡ Teste de Mann-Whitney U

Para confirmar que os achados de aumento de macrófagos associados ao grau da lesão não foram ao acaso, uma análise de poder foi repetida com os dados obtidos indicando 93,7% de poder estatístico ($P\beta$). As figuras 2 e 3 apresentam casos representativos de imunohistoquímica com anticorpo anti-CD68 para identificação de macrófagos.

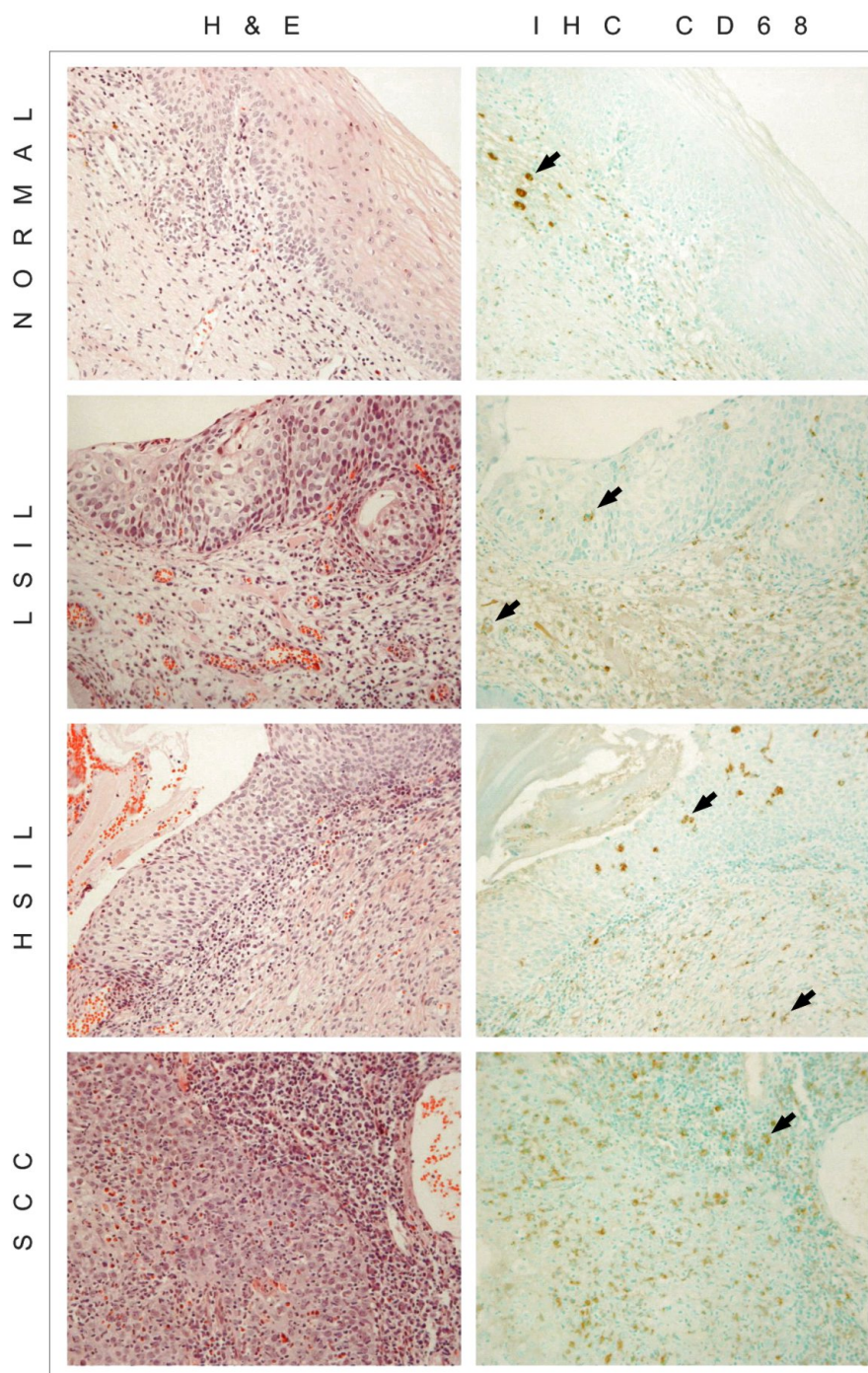


Figura 2. Painel de lâminas em H&E e respectivas imunohistoquímicas para CD68 em cérvix normal, LSIL, HSIL e SCC. Note que a presença de macrófagos (exemplos indicados por setas) e inflamação aumenta à medida que a lesão progride. **Normal** - inflamação leve com poucos macrófagos agrupados no estroma e ausência no epitélio. **LSIL** - discreta inflamação no estroma com alguns macrófagos no epitélio. **HSIL** - processo inflamatório moderado com aumento da população de macrófagos e intensa infiltração de macrófagos no epitélio. **SCC** - intensa inflamação com grande quantidade de macrófagos no estroma e epitélio. Aumento de 200X.

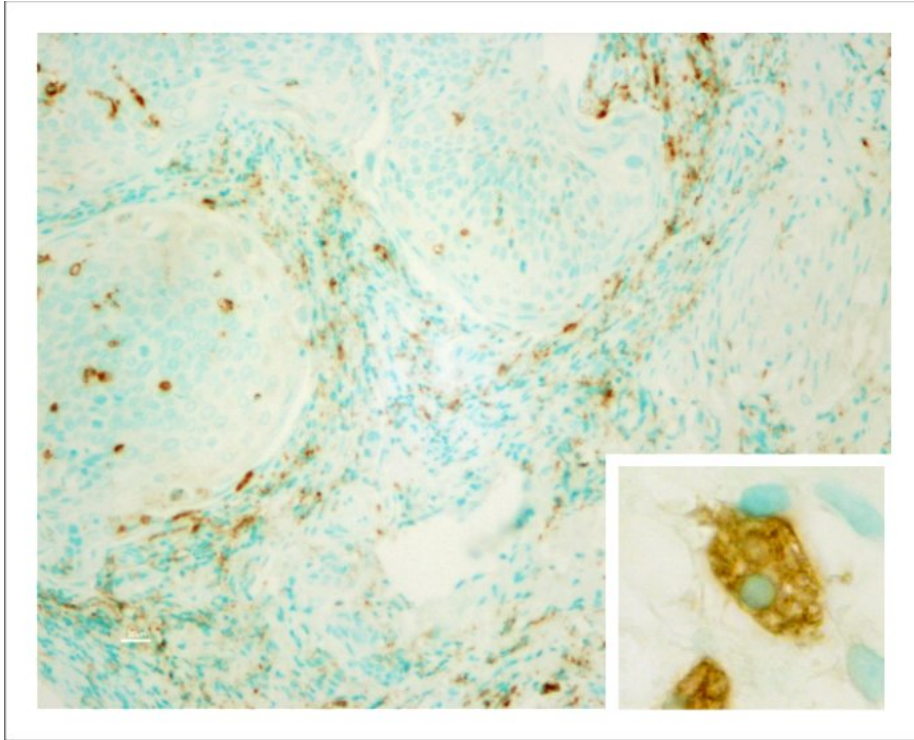


Figura 3. Imunohistoquímica para CD68 em SCC. Note que a população de macrófagos é mais intensa no estroma e claramente circunda as lesões tumorais (aumento de 200X). Detalhe: morfologia do macrófago, com intensa coloração, vacuolização e pequena projeção citoplasmática (aumento de 400X).

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra claramente uma forte correlação entre a transformação maligna da cérvix uterina e o aumento no número de macrófagos associados ao tumor, tanto no estroma, como no epitélio. Adicionalmente a esta associação, ainda detectou-se que a proporção de macrófagos no epitélio em relação ao estroma estava também associada à gravidade da lesão, o que sugere um influxo de macrófagos para o epitélio ou mesmo proliferação local.

A resposta inflamatória também foi mais evidente em lesões severas do que em lesões iniciais. Assim, devido ao fato de que macrófagos e inflamação aumentam à medida que as lesões progridem, suspeitou-se que a inflamação estivesse atraindo os macrófagos, o que era esperado fisiologicamente. Na verdade, a contagem total de macrófagos foi influenciada positivamente pelo grau de inflamação em todas as categorias de lesão analisadas. Por exemplo, em casos de LSIL, os macrófagos em regiões de moderada-intensa inflamação eram quase duas vezes mais numerosos que em regiões com negativa-fraca inflamação.

Entretanto, quando analisamos os macrófagos de acordo com o grau da lesão e controlando a análise para inflamação (i.e., usando dois grupos de análise baseados em inflamação negativa-fraca e moderada-intensa inflamação), ainda encontramos uma significativa correlação positiva entre contagem de macrófagos e grau da lesão. Este

achado fortemente indica que não só o ambiente inflamatório atrai os macrófagos, mas também as lesões displásicas promovem a migração e proliferação destas células.

Correlacionando os achados histológicos com dados clínicos das pacientes, identificamos que o infiltrado de macrófagos era maior em casos de lesões de baixo grau que persistiram ou progrediram quando comparado aos casos em que não houve persistência-progressão. Em vista do tamanho amostral reduzido, outros importantes fatores como idade, história sexual e tipagem de HPV não foram incluídos neste modelo de risco. Entretanto, fatores de risco conhecidos, tomados individualmente, como idade e presença de HPV de alto risco, não apresentaram significância estatística em nossa análise. Em contraste, a contagem de macrófagos foi estatisticamente significativa, indicando que um número aumentado de macrófagos possa ser um importante fator de risco para progressão.

Vários estudos sobre câncer de colo uterino têm identificado um aumento de macrófagos de acordo com a severidade das lesões cervicais, incluindo lesões precursoras, entretanto raramente são encontrados estudos sobre correlação clínica.^{18-24,30} Em um dos poucos estudos que se correlaciona prognóstico, macrófagos foram indicados como uma importante fonte de interleucina-8, a qual estava associada fortemente à angiogênese e pior prognóstico em lesões invasivas.²⁰ De acordo com nosso conhecimento, o presente estudo, no qual as lesões foram cuidadosamente identificadas, as áreas de epitélio e estroma foram mensuradas individualmente e os dados foram comparados ao desfecho clínico das pacientes, é o primeiro a descrever uma correlação positiva entre a alta contagem de macrófagos e persistência-progressão de LSIL.

Entretanto, outros autores têm apresentado resultados discordantes aos aqui apresentados, indicando que a densidade de macrófagos diminui à medida que as lesões progredem.^{25-27,31} Uma explicação para esta discrepância é que, na grande maioria das vezes, as lesões intraepiteliais cervicais estão restritas a determinadas áreas do epitélio e

uma correta seleção desta região é necessária para que se tenha resultados consistentes. Além disso, é importante que se observe atentamente os marcadores utilizados para macrófagos. Vários estudos que apontam um decréscimo da população de macrófagos, na verdade referem-se a um decréscimo nas células de Langerhans, que são monócitos “residentes”, altamente especializados no mecanismo de apresentação de antígeno e que constituem a primeira barreira imunológica contra o ambiente externo ao organismo.^{24,32-34} Células de Langerhans são geralmente identificadas por imunohistoquímica com anticorpos contra proteína S-100 ou CD1a, enquanto macrófagos são definidos por antígenos como CD68 e Ki-M1p.⁶

Na verdade, os estudos que usam os últimos marcadores realmente identificam um acréscimo de macrófagos associados a lesões mais graves.^{18,19,21,23,24,30} Com as informações que temos disponíveis na literatura, podemos sugerir que células de Langerhans são inicialmente suprimidas pelo tumor para permitir um crescimento inicial, mas, como mostrado pelos nossos resultados, os macrófagos são subseqüentemente recrutados para promover a progressão da doença para estágios invasores.

Em uma recente revisão de literatura, a maioria dos casos reportava que um aumento de macrófagos em tumores humanos estava relacionado a um pior prognóstico. Estas lesões incluíam câncer de mama, próstata, ovário, cérvix uterina, pulmão e bexiga. Além disso, grande parte dos estudos também mostrou uma correlação positiva entre macrófagos e angiogênese tumoral.⁵

Alguns dos principais quimioatrativos para macrófagos são produtos de células displásicas ou derivados do estroma subjacente às lesões. O fator estimulador de colônia de macrófagos (CSF-1), o qual é responsável por promover a diferenciação, proliferação e ativação de fagócitos mononucleares, tem sido identificado em altas concentrações em fluidos peritoneais e sangue periférico de pacientes com câncer cervical.¹⁵ A simples infecção pelo HPV tem sido associada também a um aumento dos níveis séricos de CSF-

1.¹² Estudos *in vitro* com células cervico-vaginais imortalizadas têm demonstrado que células do trato genital feminino também participam na resposta imunológica produzindo CSF-1.¹⁴ Outro exemplo de quimioatrativo produzido pelas células tumorais cervicais é o VEGF, também potente fator angiogênico, consistentemente encontrado em câncer cervical e suas lesões precursoras.^{10,11,16,17}

As mesmas citocinas que atraem os macrófagos, como interleucina-4 (IL-4), IL-10, fator transformador de crescimento B-1 (TGFB1) e prostaglandina E2 (PGE2), podem ser responsáveis por uma mudança no fenótipo do macrófago para transformá-lo em um agente pró-tumor.^{2,5} Uma vez ativados pelo tumor, os macrófagos perdem seu fenótipo natural, tendo pouca capacidade de apresentação de antígeno, suprimindo a proliferação de células-T, promovendo alta angiogênese e aumentando a capacidade de remodelamento de tecidos, assim permitindo a invasão de células tumorais e metastatização.³ Um exemplo de como os tumores podem “reprogramar” a atividade de macrófagos consiste em experimentos onde macrófagos foram coletados de pacientes com câncer, ativados *ex vivo* e, então, re-inseridos como terapia autóloga. Nestes experimentos, apesar do macrófago apresentar atividade anti-tumoral *in vitro*, quando re-inserido nos pacientes, perde esta capacidade.⁵

Em estágios pré-malignos, os macrófagos podem ser encontrados próximos a pontos de rompimento da membrana basal, sugerindo que suas proteases, como a uroquinase, são requeridas para facilitar a invasão de células tumorais.³ Fatores de crescimento, como fator de crescimento epidérmico, são também expressados pelo macrófagos, agindo diretamente nas células neoplásicas próximas. Além disso, os macrófagos podem secretar fatores angiogênicos como VEGF e angiogenina que, juntos com a produção do tumor, aumentam o processo de neovascularização.³⁵ Os macrófagos ainda são capazes de produzir mais proteínas quimioatrativas para eles próprios que, assim, perpetuam sua migração.

Em vista da forte correlação com tumores, macrófagos têm sido considerados como um alvo atrativo para terapias. Os macrófagos apresentam um genoma estável, com raras mutações, e, assim, com poucas chances de desenvolver resistência a drogas. O bloqueio de certos passos do processo de interação macrófago-tumor poderia promover o controle do crescimento do câncer cervical. De fato, a remoção de macrófagos em experimentos com ratos com carcinoma de mama, pela inativação por mutação de CSF-1, reduziu marcadamente os índices de crescimento tumoral e de metastatização.³⁶ Outra interessante intervenção com o uso de macrófagos seria transfectá-los *ex vivo* com genes que codificassem agentes anti-tumorais, como fatores anti-angiogênicos, e reinserí-los nos tumores. Estudos iniciais sobre este tipo de terapia têm demonstrado a habilidade dos macrófagos em migrarem para áreas hipóxicas da massa tumoral e eficientemente expressar os produtos dos genes manipulados.²

Em conclusão, este estudo indica que macrófagos CD68+ estão associados com a progressão da carcinogênese cervical, de lesões intraepiteliais ao estágio invasor. Os macrófagos aumentaram linearmente com a progressão de NIC, migrando do compartimento estromal para o epitélio, e eram influenciados não só pelo processo inflamatório, mas também pelas células displásicas. Adicionalmente, também se sugere que um aumento na população de macrófagos possa ser fator de risco para persistência ou progressão de LSIL. Enfim, estes resultados sugerem que macrófagos são uma importante opção a ser considerada na pesquisa de tratamentos para câncer de colo uterino e, ainda, em estudos futuros, devem ser também considerados como potenciais biomarcadores para risco de progressão da doença.

10.2. Versão em inglês

**MACROPHAGES, INFLAMMATION AND RISK OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL
NEOPLASIA (CIN) PROGRESSION - CLINICOPATHOLOGICAL CORRELATION**

Luciano S. Hammes^{1 2}, Rajeshwar Rao Tekmal², Paulo Naud¹, Maria Isabel Edelweiss⁴,
Nameer Kirma², Philip T. Valente⁵, K Syrjänen⁶, João Sabino Cunha-Filho¹.

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Health Science Center at
San Antonio, San Antonio, TX, USA

³ Department of Biostatistics, Bioinformatics & Epidemiology, Medical University of South
Carolina, Charleston, SC, USA

⁴ Department of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁵ Department of Pathology, University of Texas Health Science Center at San Antonio,
San Antonio, TX, USA

⁶ Department of Oncology & Radiotherapy, Turku University Hospital, Turku, Finland

Correspondence and reprint requests: Luciano S. Hammes, MD, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, TX 78229-3900, USA. Phone: +1. 210.567.4930. FAX: +1.210.567.4958. Email: hammes@cpovo.net

Key words; macrophages, monocytes, CD68 protein, immunohistochemistry, inflammation, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer, disease progression, biomarker

Running title: Macrophages, inflammation and CIN

Acknowledgments: This work was supported by Grant 0629/05-7 from the Foundation for the Coordination of Higher Education and Graduate Training (CAPES), Brazil, by Grant 05-154 from Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Incentive Fund (HCPA-FIPE), Brazil, and by Latin American Screening Study, funded by European Commission, INCO-DEV Contract # ICA4-CT-2001-10013. We thank Mr. Gregory A. Langone, Ms. Joanne Click and Ms. Renata Pedrini for technical assistance. We are grateful also to Prof. Nadine Clausell Ph.D. and Ms. Indara Carmin for their unique support of this project.

ABSTRACT

Macrophages have been associated with poor prognosis and severity of lesions in many different tumors. However, little is known about the influence of macrophage populations on clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

With intention to evaluate this correlation, a series of biopsies from 26 normal cervix, 28 low-grade (LSIL), 30 high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) and 28 squamous cell carcinomas (SCC) were stained by H&E to assess inflammation and using immunohistochemistry (IHC) with anti-CD68 to detect macrophages. The macrophage count was corrected for the epithelial and stromal compartments using appropriate software. Prospective follow-up data from the patients with normal, LSIL and HSIL lesions were available, and all patients were also tested for high-risk HPV by Hybrid Capture 2.

We identified that macrophage count increased linearly with disease progression (median count per case: normal, 5.1; LSIL, 5.5; HSIL, 9.9; SCC, 14.5; $P < 0.001$). Inflammation also gradually increased with disease progression (moderate-intense inflammation present in 25%, 46.1%, 58.4% and 89.3% of normal, LSIL, HSIL and SCC, respectively; $P < 0.001$), and paralleled the macrophage count. However, when controlled for inflammation, the macrophage count was still associated with the lesion grade ($P < 0.001$). Moreover, macrophages showed an increasing migration into the epithelium with increasing grade of the lesion. Of the 24 LSIL lesions with information available, followed-up for 805 ± 140

days, 16 regressed, 6 persisted (for a mean of 512 ± 140 days) and 2 progressed. Age, high-risk HPV or inflammation were not risk factors for persistent/progressed LSIL in our cohort. However, lesions that persisted or progressed showed a higher macrophage count [median (25-75th percentile)], 10.8 (5-16.2) than lesions that regressed, 7 (2.7-9.1) ($P=0.031$).

In conclusion, the study on macrophages offers a potential approach for cervical cancer treatment, since macrophages are closely related to progression of CIN, and can be used as an applicable marker of such a risk.

INTRODUCTION

Malignant tumors are complex structures that for purposes of growth and invasiveness must interact with the surrounding environment. The ultimate goal of this interaction is to promote blood supply, block negative growth signals, increase positive growth signals, create resistance to apoptosis and promote unlimited cell replication.¹⁻³

Convincing data has emerged in recent years that inflammation plays an important role in this process. Epidemiological studies have demonstrated that the use of anti-inflammatory drugs is associated with a reduced risk of cancer as well as with a decrease of precancer lesions.⁴ Among the inflammatory cells, tumor-associated macrophages (TAM) have been identified as important components not only in terms of their number but also with regard to their function.^{2,5}

Macrophages are derived from bone marrow monocytes that adopt different phenotypes when entering the circulatory system. While in tissues, monocytes give rise to a variety of tissue dendritic cells (called Langerhans cells in the epidermis), macrophages and osteoclasts. Langerhans cells (LC) are “resident” monocytes that constitute the first immunological barrier against pathogens and environmental insults. Macrophages, stimulated by inflammation, migrate later, and because of this, these cells are also referred to as “inflammatory” monocytes.⁶⁻⁸

In benign conditions, macrophages protect tissues from bacterial infections, regulate tissue remodeling and repair injuries, thereby functioning as an essential cellular

component of the innate immune system. Macrophages are able to secrete a wide array of cytokines, growth factors, lysozymes, proteases, complement components, coagulation factors and prostaglandins.^{1,3} However, in tumors, macrophages can exhibit a different phenotype and thus contribute to tumor growth, invasiveness, metastases, local immunoregulation and angiogenesis.⁵ In several different tumors, the accumulation of macrophages, which sometimes is the main component of the inflammatory infiltrate, is associated with worst prognosis as, for example, breast and ovary carcinoma.⁵

It has been described that cervical cancer cells also express macrophage attractants, including monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) , macrophage colony stimulating factor-1 (CSF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF), not only locally but also identifiable in the peripheral blood.⁹⁻¹⁷ For example, CSF-1 serum levels are elevated in cases with cervical human papillomavirus (HPV) infection and cervical intraepithelial neoplasia (CIN).¹² However, data are conflicting on the role of macrophages in cervical carcinogenesis. Some authors have demonstrated that macrophages increase along with the progression of CIN to invasive cancer, but analyses regarding prognosis and correlation with HPV infection are rarely discussed.¹⁸⁻²⁴ Furthermore, other authors have described that the macrophage population decreases in CIN as compared to normal cervix, attributing this reduction to the presence of HPV E6 and E7 oncogenes.²⁵⁻²⁹

To elucidate this issue, association of macrophages with malignant transformation of the cervix and risk of lesions progression, we conducted a careful analysis of inflammatory reaction and macrophages in samples of the normal cervix, all grades of CIN and squamous cell carcinoma (SCC), using H&E staining and immunohistochemistry (IHC) with anti-CD68 antibody.

MATERIAL AND METHODS

Design and subjects

Routine cervical biopsies from women participated in cervical cancer screening between 2000 and 2003 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, were selected for analysis. Lesions were categorized as normal cervix, low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL, equivalent to CIN 1), high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL, which comprises CIN 2 or CIN 3) and SCC.

Normal cervix, LSIL and HSIL samples were selected from a cohort of patients screened for cervical cancer by conventional Pap smear, naked eye visual inspection with acetic acid (VIA) and Lugol's iodine (VILI), HPV testing for high-risk HPV and, when necessary, colposcopy and biopsy. The cohort is part of the Latin America Screening Study (LAMS Study).

Biopsies were performed with intention of diagnosis and not excision, preserving the lesions at the cervix. Patients with HSIL or higher were promptly submitted for appropriate treatment. LSIL cases were followed by visits every 6 months, when Pap smear, VIA, VILI, HPV testing (this exam every 12 months) and colposcopy were performed. For the analysis of LSIL outcome, we considered: a) progression, when LSIL region became subsequently CIN 2, 3 or SCC at biopsy; b) persistence, when LSIL lesion remained with the same histological diagnosis during follow-up for more than 330 days (second biopsy was necessary to confirm diagnosis); and c) regression, when the lesion previously diagnosed was not visible any more at colposcopic examination or, even with colposcopic changes, the subsequent biopsy at the same place did not show lesion. To assure that

benign histological samples were, in fact, normal, only samples that were negative for high-risk HPV were included in the normal category.

Squamous cell carcinoma samples were selected from archival paraffin blocks, derived from women who were treated during the same period in this same hospital, but not included in the LAMS cohort. All biopsies were fixed in formaldehyde and embedded in paraffin according to routine procedures. Local ethics committee approval was obtained prior to any procedure.

Selection of regions for analysis

Samples were cut at 4 μ m, with the first section stained with H&E to confirm the histological diagnosis accessed by two independent pathologists, and subsequent section was stained for CD68 by IHC. For each H&E slide, a mean of three representative areas of the lesion were selected at X200 magnification (blind to IHC results), and marked for subsequent analysis on the IHC slides.

HPV Testing

HPV testing was carried out by the Hybrid Capture 2 assay (HCII - Digene Corporation; Gaithersburg, MD) using cervical swabs collected before biopsies. Samples were analyzed by automated HCII test system for the presence of high-risk HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68, according to manufacturer protocol. For each specimen, RLU/CO values were calculated as the ratio of the specimen luminescence (RLU) relative to the luminescence of the 1.0 pg/ml HPV-16 cutoff standard

(CO, 100,000 HPV-16 genomes/ml) and values equal to or higher than 1 RLU/CO were considered positive.

Immunohistochemistry

Slides were dried at 60°C for 20 minutes, de-paraffinized in xylene, re-hydrated through a graded ethanol series and then washed with distilled water. Antigen retrieval was achieved first by boiling the tissues in citrate buffer, pH 6.0, for 20 minutes and then by cooling the slides for 20 minutes. Slides were then placed in a semi-automated immunostainer (Sequenza, Thermo Electron Corporation; Waltham, MA).

IHC was carried out with the avidin-biotin complex (ABC), using LV's Ultravision® Kit (Labvision Corporation; Fremont, CA), at room temperature (RT), according to the manufacturer's instructions. Hydrogen Peroxide Block was applied for 12 minutes to quench endogenous peroxidase activity followed by Ultra V Block for 5 minutes to block biotin. Slides were incubated with primary antibody mouse monoclonal anti-human CD-68 diluted at 1:100 for 30 minutes at RT (cat. #MS-1808-S; Labvision Corporation). CD68 is a trans-membrane glycoprotein that is highly expressed in human macrophages and its precursors, monocytes, and rarely by LC. For purposes of this study, macrophages and its precursors CD68 positive (CD68+) will be referred as macrophages.

Subsequently, biotinylated secondary antibody, goat anti-mouse, was applied for 30 minutes followed by streptavidin-peroxidase for 10 minutes. Immunoreactive complexes were detected using diaminobenzidine chromogen exposure for 5 minutes. Finally, slides were counterstained with methyl green for 5 minutes, washed in distilled water, dehydrated in graded ethanol, cleared with xylene and mounted.

Negative controls were concomitantly processed by omitting the primary antibody. Tonsil slides were used as positive controls. Because it was technically not possible to manage all slides at the same time, each IHC batch contained exactly the same proportion of normal, LSIL, HSIL, SCC, negative and positive controls slides.

Interpretation

H&E and IHC images were captured according to the areas pre-selected on H&E slides using a Nikon DXM 1200F digital camera microscope, with X200 objective lens (Nikon; Melville, NY) and were stored and processed in a personal Windows-based PC. Each acquired image represents an area of 0.28 mm².

Intensity of stromal inflammation was evaluated on H&E images using four categories: 0 - no inflammation; 1 - weak inflammation; 2 - moderate inflammation; and 3 - intense inflammation.

For IHC interpretation, images were then opened in Corel Photo Paint X3 (Corel Corporation; Eden Prairie, MN), and manual marking of each CD68+ cell was performed. The use of images allowed us to zoom in specific regions and analyze details of the X200 microscopic fields. CD68+ cells with a completely or partially visible nucleus were counted, while CD68+ debris, for example cell membrane fragments, were not counted.

Additionally, the area of the epithelium and the stromal compartment were separately measured with Corel Draw X3 (Corel Corporation; Eden Prairie, MN) and the number of macrophages was corrected proportionate to these areas, using the following formulas: a) final number of macrophages in the stroma = (number of macrophages in the stroma x 100) / percentage of stroma in the image; and b) final number macrophages in the

epithelium = (number of macrophages in the epithelium x 100) / percentage of epithelium in the image. For the total count of macrophages, we summed-up the epithelial and stromal macrophage counts and divided that by two.

Statistical Analysis

IHC measurements were accessed in two different ways. To demonstrate the presence of CD68+ macrophages in normal, LSIL, HSIL and SCC stages, each case was considered as a mean of all regions counted. To show the association between inflammation and macrophages and to evaluate the risk of progression, each region was considered as an individual value in the analysis.

Comparisons of macrophage populations in each CIN grade were evaluated by non-parametric Kruskal-Wallis test and proportions by Pearson Chi-Square. Means of variables with normal distribution were compared by Student t-test. In all tests, $P < 0.05$ was considered statistically significant. Macrophage counts that presented non-normal distribution were shown in median, 25th- and 75th percentiles. Values with normal distribution are presented as mean \pm standard deviation (SD).

The power analysis indicated that to detect the difference of 10 in the macrophage counts in each lesion category with power of 80% and significance level of 5%, a sample size of 27 cases in each group was required.

RESULTS

We have studied the rate of macrophage infiltration by examining their number in precancerous cervical lesions (LSIL and HSIL) and carcinomas as compared to normal cervical tissue. The present series comprises 112 patients, including 26 normal, 28 LSIL, 30 HSIL and 28 SCC cases. In total, 324 different regions were analyzed.

A direct relationship was found between the increasing grade of the lesion and the number of macrophages in the epithelium, in the stroma and the total macrophage counts analyzed together (figure 1).

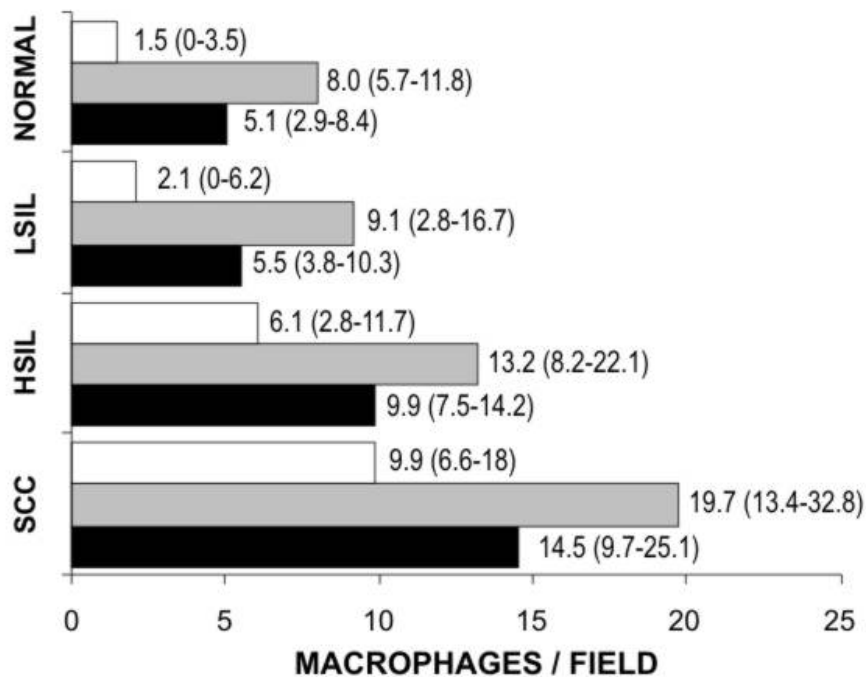


Figure 1. Macrophage counts (per X200 field) in epithelium (white bars), stroma (gray bars) and both compartments combined (black bars) in different lesions. The macrophage counts were not different between normal cervix and LSIL (Mann-Whotney U test) in the epithelium ($P=0.653$), stroma ($P=0.119$) and combined ($P=0.328$). However, in all other comparisons, macrophages counting was statistically different (Kruskal-Wallis test), both in the epithelium ($P<0.001$), stroma ($P<0.001$) and combined ($P<0.001$). Values presented in median (25th-75th percentile).

The stromal compartment constantly showed higher macrophage counts than the epithelium. This difference decreased as the lesions progressed, indicating a macrophage switch from the stroma to the epithelium. The epithelial infiltrating macrophages represented 0% (0-26.7%), 13.5% (0-45%), 25% (7.1%-48.3%) and 31.3% (18.3%-47.1%) of all macrophages in normal, LSIL, HSIL and SCC samples, respectively ($P<0.001$).

Intensity of the inflammatory reaction was also closely associated with the lesion grade (table 1). For example, using the negative–weak and moderate–intense inflammation as cut-off, normal, LSIL, HSIL, and SCC regions were positive for inflammation in 25%, 46.1%, 58.4% and 89.3% of the regions analyzed, respectively ($P<0.001$).

Table 1. Inflammation as related to cervical lesion grade

Lesion grade	INTENSITY OF INFLAMMATION							
	Negative		Weak		Moderate		Intense	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Normal	18	23.7	39	51.3	14	18.4	5	6.6
LSIL	7	9.3	33	44	16	21.3	19	25.3
HSIL	8	9	29	32.6	32	36	20	22.5
SCC	0	0	9	10.7	27	32.1	48	57.1
Total (n=324)	33	10.2	110	34.0	89	27.5	92	28.4

Pearson Chi-Square, $P<0.001$; N, number of regions analyzed.

Macrophages were consistently more frequent in inflammatory regions in normal, LSIL, HSIL and SCC cases, using a cutoff negative–weak and moderate–intense inflammation (table 2). Macrophage counts among negative-weak and moderate-intense inflammatory reactions are related to lesion grade in Table 2. A significant relationship between the macrophage count and the lesion grade still existed, irrespective of the density of the inflammatory reaction.

Table 2. Inflammation and total number of macrophages in different lesions

Lesion grade	TOTAL NUMBER OF MACROPHAGES*				P †
	negative – weak inflammation		moderate-intense inflammation		
Normal	4.00	(2.04-6.46)	6.90	(3-11.25)	0.041
LSIL	4.58	(2-7.38)	7.78	(5-16.25)	0.001
HSIL	8.00	(5-12.69)	12.05	(8.14-16.56)	0.003
SCC	8.75	(5.46-12.29)	16.27	(8.75-24.96)	0.044
P ‡	<0.001		<0.001		

* Per field magnification X200, values in median (25th-75th percentile)

† Mann-Whitney U test for comparison of macrophage count between negative-weak and moderate-intense inflammation

‡ Kruskal-Wallis test for comparison of macrophage count between different lesion grades, controlling for inflammation

Results of high-risk HPV testing were available for 26 normal, 23 LSIL and 30 HSIL cases with 0%, 78.3% and 93.3% of positive results (Pearson Chi-Square, $p < 0.001$). Interestingly, macrophage counts were not different between high-risk HPV positive and -negative cases, as stratified by the lesion grade.

Finally, we have examined if a correlation exists between macrophages infiltration and clinical outcome (persistence-progression) of LSIL, based on follow-up data of 24 LSIL patients (mean age 32.9 ± 7.5), followed-up for 805 ± 140 days. A total of 16 patients (66.7%) had their lesions regressed during follow-up, 6 (25%) patients persisted (for a mean of 512 ± 140 days) and 2 (8.3%) progressed to HSIL/carcinoma. In a linear regression model, patient's age, HPV status or inflammation were not risk factors for persistence/progression, but the total macrophage count in LSIL lesions that regressed was lower than in persistent-progressed lesions (table 3).

Table 3. Risk of LSIL progression according to age, HPV status and total number of macrophages

Risk factor	LSIL		<i>P</i>
	regression (N=16 cases; 42 regions)	persistence-progression (N=8 cases; 22 regions)	
Age (years; mean ± SD)	30.5 ± 7.9	34.1 ± 7.2	0.599*
High-risk HPV test (positive rate)	62.5%	80%	0.363†
Inflammation moderate-intense	47.6%	40.9%	0.609†
Macrophages (median; 25 th -75 th percentile)	7 (2.7-9.1)	10.8 (5-16.2)	0.031‡

* Student t-test; † Pearson Chi-Square test; ‡ Mann-Whitney U test

To confirm that our results, which showed an increase of macrophage population according to lesion grade, were not by chance, a power analysis was repeated indicating 93.7% of statistical power ($P\beta$). Figures 2 and 3 present representative cases of IHC with antibody anti-CD68 for macrophages identification.

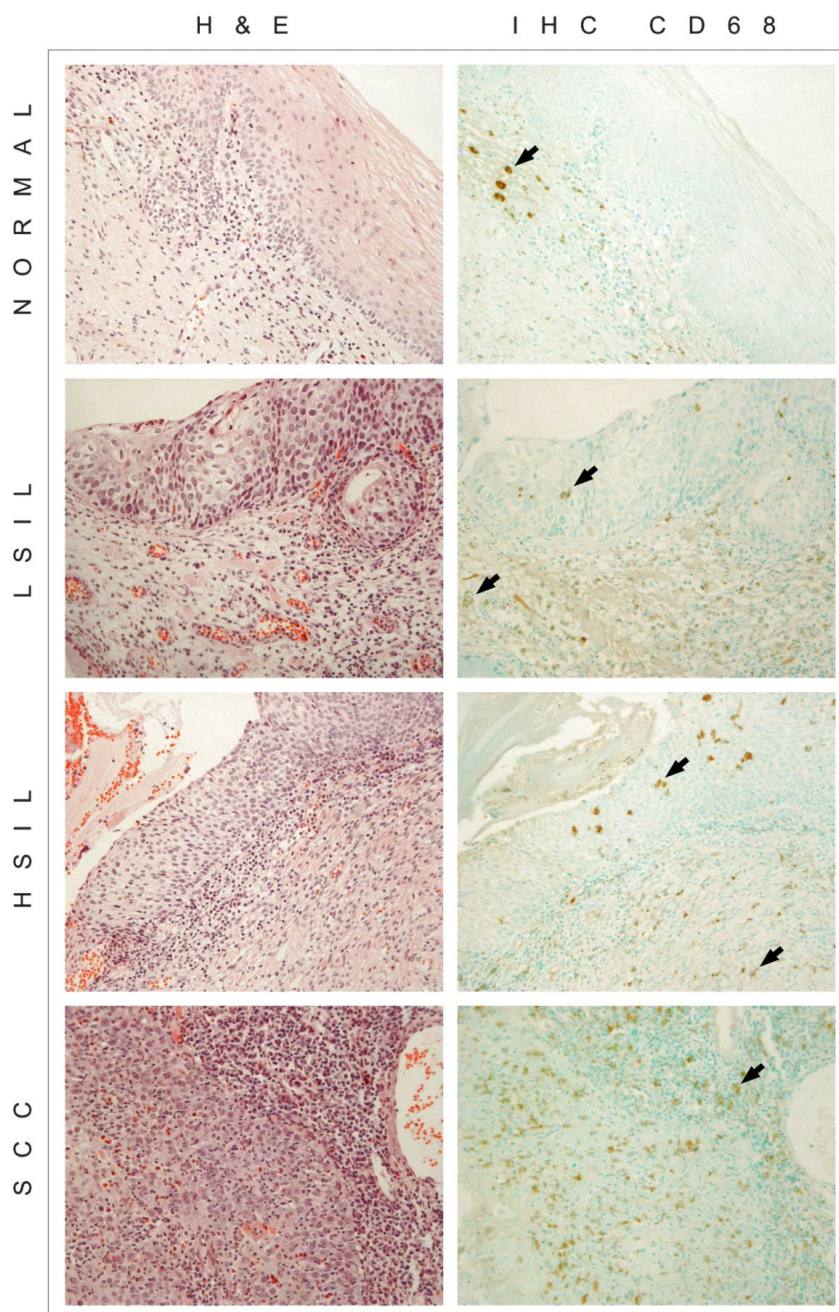


Figure 2. Panel of H&E slides and respective IHC staining for CD68 in normal cervix, LSIL, HSIL and SCC. Note that the presence of both macrophages (black arrows) and inflammation increase as the lesions progressed. **Normal case** - weak inflammatory stroma with few macrophages and absence of macrophages in the epithelium. **LSIL** - weak inflammation with few macrophages in the stroma and scattered macrophages in the epithelium. **HSIL** - moderate inflammation with the increase of macrophage population and various infiltrating the epithelium. **SCC** - intense inflammation and high count of macrophages in the epithelium and in the stroma. Magnification X200.

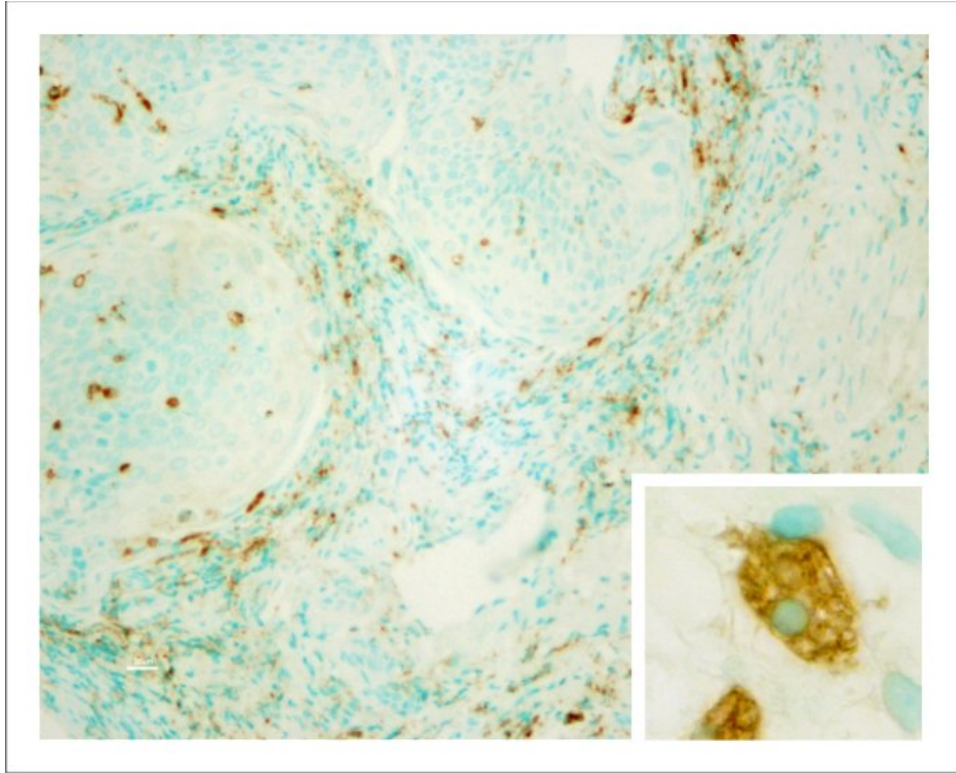


Figure 3. Immunohistochemistry staining for CD68 in SCC. Intense macrophage infiltration is evidenced in stroma surrounding epithelium of SCC (magnification X200). Inset: macrophage morphology, with intense cytoplasmic staining, microvacuolization and small cytoplasmic projection (magnification X400).

DISCUSSION

Our study clearly demonstrates a strong association between the malignant transformation of the cervix and an increase in the number of tumor-associated macrophages in the stroma as well as in the epithelium. Except for the real increase of macrophages upon lesion progression, we detected also a augment of macrophage population in the epithelium proportionally to stroma, suggesting that there is a influx of macrophages into the epithelium or local proliferation.

Additionally, the inflammatory response was more evident in severe lesions than in normal cervix. Given that macrophages and inflammation increased in parallel with the progressive lesions, we suspect that the inflammation attracted macrophages, as could be anticipated physiologically. Indeed, the overall macrophage population was positively influenced by the degree of inflammation in all lesion categories. For example, in LSIL cases, the macrophages in moderate-intense inflammatory regions were almost two times more numerous than in negative-weak reactions.

However, when we analyzed macrophages according to the lesion grade and controlled for inflammation (i.e., using the negative–weak and moderate–intense cut-offs), we still found a significant positive correlation between macrophage counts and lesion grade. This argues strongly that the inflammatory environment not only attracts macrophages but that the lesion also itself also attracts and influence the proliferation of these cells.

As related with patients' clinicopathological data, macrophage infiltrations were higher in low-grade lesions which persisted-progressed than in those that did not persisted-progress. Because of our limited sample size, other important factors such as age, sexual history and HPV type were not included in this model of risk analysis. However, individual risk factors, such as age and HPV status did not reach statistical significance in our analysis. By contrast, the macrophage count was statistically significant, thus indicating that an increased number of macrophages may be an important risk factor for lesion progression.

Many studies on cervical cancer have identified a significant increase of macrophages according to the severity of cervical lesions, including cancer precursors, were few studies have addressed clinical correlations.^{18-24,30} In one of the rare studies about prognosis, macrophages were a significant source of interleukin-8 that was closely associated with micro-vessel density and poor prognosis in invasive disease.²⁰ To our knowledge, our description, where lesions were carefully identified, epithelium and stroma areas were measured separately and data were compared to clinical outcome, is the first positive correlation of macrophage count and cervical intraepithelial lesion persistence-progression.

However, some authors have argued the exact opposite, i.e., macrophage density decreases with disease progression.^{25-27,31} One explanation for this discrepancy is that most of the time, CIN lesions are restricted to a very specific area of the epithelium and a correct selection of this area is required to assure consistent results. Moreover, it is necessary to pay close attention to the markers used for macrophages. Most studies that refer to a decrease in macrophage population, actually point to a decrease in Langerhans cells that are the resident-monocytes, highly specialized in antigen-presenting and constitute the first immunological barrier against the external environment.^{24,32-34} Langerhans cells are generally stained with an antibody against S-100 protein or CD1a,

whereas macrophages are defined by antigens like CD68 and Ki-M1p. Indeed, the studies using the latter constantly report an increase of macrophages towards high-grade lesions and cancer.^{18,19,21,23,24,30} As determined from the published literature, Langerhans cells are initially suppressed by the tumor to permit an initial growth, but as shown by our results, macrophages are subsequently recruited to support the progression to invasive malignancy.

In the recent literature, the majority of the studies reported an increase of macrophages in human tumors to be related to poor prognosis. Such lesions include cancer of the breast, prostate, ovary, uterine cervix, lung and bladder. Most of these studies also reported a positive correlation between macrophages and tumor angiogenesis.⁵

Some of the main macrophage chemoattractants are products of dysplastic cervical cells or derived from the surrounding stroma. Macrophage-colony stimulating factor (CSF-1), which is responsible for promoting differentiation, proliferation and activation of mononuclear phagocytes, has been identified at high concentrations in the peritoneal fluid and serum of patients with cervical cancer.¹⁵ A single infection by HPV has been associated also with an increase of CSF-1 serum levels.¹² In vitro studies with immortalized cervico-vaginal cell lines have demonstrated that epithelial cells in the lower female genital tract also participate in the immunological function producing CSF-1.¹⁴ Another example of chemoattractant produced by cervical tumoral cells is VEGF, a potent pro-angiogenic cytokine, largely found in cervical cancer and its precursor lesions.^{10,11,16,17}

The same cytokines that attract macrophages, such as interleukin-4 (IL-4), IL-10, transforming growth factor β -1 (TGF β -1) and prostaglandin E2 (PGE2), can be responsible for changing the macrophage phenotype to become a pro-tumor agent.^{2,5} Once activated by tumors, macrophages lose their natural phenotype, resulting in poor

antigen presenting capability, suppressing T-cell proliferation, promoting higher angiogenesis and increasing their capability to remodel tissues, thereby allowing tumor cell invasion and metastasis.³ As an example how the tumor might suppress macrophage activity are experiments, where macrophages collected from the patients, activated ex vivo and then re-infused as autologous therapies, are not effective as anti-cancer therapy.⁵

In pre-malignant stages, macrophages can be found close to the points of basal membrane disruption, suggesting that their proteases, such as urokinase, are required to facilitate the invasion of tumor cells.³ Growth factors, such as epidermal growth factor, are also released by macrophages, acting directly upon the surrounding tumor cells. In addition, macrophages can secrete angiogenic factors, such as VEGF and angiogenin that supplement tumor production, thereby enhancing the neovascularization.³⁵ Finally, macrophages are capable of producing more chemoattractant proteins that, in turn, perpetuate their migration in an infinite feedback loop.

Because of the close relationship between macrophages and tumors, macrophages have been considered an attractive target for therapies. Macrophages have a stable genome, with rare mutations, and therefore with fewer chances of developing drug resistance. Blockage of some steps of macrophage-tumor interaction may promote tumor growth control. In fact, removal of macrophages in a mice breast carcinoma model, by null mutation of CSF-1, reduced markedly the rate of tumor growth and metastasis.³⁶ Another interesting approach in macrophage therapy is by transfecting macrophages ex vivo with genes encoding for anti-cancer agents, as anti-angiogenic factors, and reinserting them in the tumors. Initial studies have demonstrated the ability of macrophages to migrate into hypoxic areas of tumor mass and effectively deliver the manipulated gene products.²

In conclusion, our study indicates that CD68+ macrophages are associated with progression of cervical carcinogenesis from intraepithelial lesions to invasive stages.

Macrophages increase linearly with the progression of CIN, migrating from the stromal compartment into the epithelium, and are influenced not only by inflammation itself but also by the dysplastic (transformed) cells. Additionally, our data suggest that macrophages can be a risk factor for persistence or progression of LSIL. Taken together, these results suggest that macrophages might offer a novel approach for cervical cancer treatment, and in upcoming trials, macrophages should be investigated as a potential marker of disease progression.

10.3. Referências bibliográficas

1. Condeelis J, Pollard JW: Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006, 124:263-266
2. Murdoch C, Lewis CE: Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *Int J Cancer* 2005, 117:701-708
3. Lewis CE, Pollard JW: Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006, 66:605-612
4. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM, Blanke C: Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective - Role of COX-2 inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett* 2004, 215:1-20
5. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE: The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002, 196:254-265
6. Ratzinger G, Burgdorf WH, Metze D, Zelger BG, Zelger B: Indeterminate cell histiocytosis: fact or fiction? *J Cutan Pathol* 2005, 32:552-560
7. Gordon S, Taylor PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005, 5:953-964

8. Palucka AK, Banchereau J: Langerhans cells: daughters of monocytes. *Nat Immunol* 2006, 7:223-224
9. Riethdorf L, Riethdorf S, Gutzlaff K, Prall F, Loning T: Differential expression of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in human papillomavirus-16-infected squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the cervix uteri. *Am J Pathol* 1996, 149:1469-1476
10. Dai Y, Zhang X, Peng Y, Wang Z: The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005, 97:96-103
11. Branca M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Ciotti M, Benedetto A, Paba P, Costa S, Bonifacio D, Di Bonito P, Accardi L, Favalli C, Syrjanen K: Aberrant expression of VEGF-C is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high risk HPV, but does not predict virus clearance after treatment of CIN or prognosis of cervical cancer. *J Clin Pathol* 2006, 59:40-47
12. 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* 1999, 180:28-32
13. Suzuki M, Ohwada M, Sato I, Nagatomo M: Serum level of macrophage colony-stimulating factor as a marker for gynecologic malignancies. *Oncology* 1995, 52:128-133
14. Fichorova RN, Anderson DJ: Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Biol Reprod* 1999, 60:508-514

15. Punnonen R, Teisala K, Kuoppala T, Bennett B, Punnonen J: Cytokine production profiles in the peritoneal fluids of patients with malignant or benign gynecologic tumors. *Cancer* 1998, 83:788-796
16. Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, Matsui H, Seki K, Sekiya S: Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 2005, 103:724-730
17. Kodama J, Seki N, Tokumo K, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M, Okuda H, Kudo T: Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999, 35:485-489
18. Zijlmans HJ, Fleuren GJ, Baelde HJ, Eilers PH, Kenter GG, Gorter A: The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2. *J Pathol* 2006, 208:507-517
19. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D: Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002, 161:947-956
20. Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Tamaya T: Clinical implications of expression of interleukin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *Cancer Res* 2000, 60:2632-2635
21. Hachisuga T, Fukuda K, Hayashi Y, Iwasaka T, Sugimori H: Immunohistochemical demonstration of histiocytes in normal ectocervical epithelium and epithelial lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1989, 33:273-278

22. Takehara K: [Local immune responses in uterine cervical carcinogenesis]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1996, 48:1063-1070
23. Tay SK, Jenkins D, Maddox P, Hogg N, Singer A: Tissue macrophage response in human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol* 1987, 94:1094-1097
24. al-Saleh W, Delvenne P, Arrese JE, Nikkels AF, Pierard GE, Boniver J: Inverse modulation of intraepithelial Langerhans' cells and stromal macrophage/dendrocyte populations in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Virchows Arch* 1995, 427:41-48
25. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J: Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol Res Pract* 1997, 193:491-495
26. Kleine-Lowinski K, Gillitzer R, Kuhne-Heid R, Rosl F: Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1999, 82:6-11
27. Heller DS, Hameed M, Cracchiolo B, Wiederkehr M, Scott D, Skurnick J, Ammar N, Lambert WC: Presence and quantification of macrophages in squamous cell carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2003, 13:67-70
28. Kleine-Lowinski K, Rheinwald JG, Fichorova RN, Anderson DJ, Basile J, Munger K, Daly CM, Rosl F, Rollins BJ: Selective suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in human cervical epithelial and epidermal cells. *Int J Cancer* 2003, 107:407-415

29. Riethdorf S, Riethdorf L, Richter N, Loning T: Expression of the MCP-1 gene and the HPV 16 E6/E7 oncogenes in squamous cell carcinomas of the cervix uteri and metastases. *Pathobiology* 1998, 66:260-267
30. Nagy T, Glavinas H, Szincsak N, Hunyadi J, Janossy T, Duda E, Vizler C, Juhasz I: Tumor cells expressing membrane-bound tumor necrosis factor activate macrophages and have a compromised growth in immunosuppressed and immunodeficient mice. *Cancer Lett* 2003, 196:49-56
31. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Lerner-Geva L, Ben-Baruch G, Agulansky L, Novikov I, Kopolovic J: Macrophage infiltration and angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma--clinicopathologic correlation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999, 78:240-244
32. Giannini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P: Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer* 2002, 97:654-659
33. Connor JP, Ferrer K, Kane JP, Goldberg JM: Evaluation of Langerhans' cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1999, 75:130-135
34. Uchimura NS, Ribalta JC, Focchi J, Simoes MJ, Uchimura TT, Silva ES: Evaluation of Langerhans' cells in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2004, 31:260-262

35. Sica A, Saccani A, Mantovani A: Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *Int Immunopharmacol* 2002, 2:1045-1054
36. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW: Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 2001, 193:727-740

11. CONCLUSÕES

O uso de interpretação computadorizada por meio de software de baixo custo e sistema de cores CMYK mostrou bons resultados na investigação por imunohistoquímica de biomarcadores do processo de carcinogênese cervical.

Com o uso dos valores do canal de cor magenta, obteve-se um índice (denominado score-magenta) que é mais fácil de ser interpretado que escores propostos anteriormente por outros estudos e comparável à interpretação manual. Os resultados são objetivos e extremamente reprodutíveis, reduzindo a variabilidade intra e interobservadores. Laboratórios e centros de pesquisa com recursos limitados podem se beneficiar com o uso desta técnica simples.

VEGF, c-fms e COX-2 mostraram correlação com o processo de malignização da cérvix uterina, aumentando sua expressão à medida que as lesões acentuavam-se, sendo assim indicados como importantes alvos terapêuticos a serem avaliados.

O aumento de VEGF apresentou importante contribuição do estroma adjacente em lesões intraepiteliais e carcinoma invasor. COX-2 e c-fms influenciaram a expressão de VEGF em lesões intraepiteliais de alto grau e em estágios invasores, indicando que potencialmente contribuem para o processo de angiogênese cervical.

Adicionalmente, quando analisamos somente lesões intraepiteliais cervicais, c-fms e COX-2 foram considerados fatores de risco para que estas lesões fossem classificadas como de alto grau. Assim, sugere-se que estes sejam utilizados como potenciais biomarcadores em estudos futuros.

No estudo de macrófagos, evidenciou-se que estes estão associados com o grau das lesões cervicais, do estágio intraepitelial até o invasor. Os macrófagos aumentaram progressivamente com a gravidade de NIC, migrando do compartimento estromal para o epitélio, e eram influenciados não só pelo processo inflamatório, mas também pelas células displásicas.

A inflamação por sua vez, também aumentou progressivamente no processo de malignização da cérvix uterina, sendo classificada como fraca ou ausente na maioria dos casos de cérvix normal e como intensa na maioria dos casos de tumores cervicais invasores.

Quando se correlacionou a análise de macrófagos e dados clínicos das pacientes, identificou-se a população de macrófagos aumentada como um fator de risco para a persistência-progressão de lesões cervicais intraepiteliais de baixo grau.

Estes resultados sugerem que macrófagos são uma importante opção a ser considerada na pesquisa de tratamentos para câncer de colo uterino e, ainda, em estudos futuros, devem ser também considerados como potenciais biomarcadores para risco de progressão da doença.

12. PERSPECTIVAS

O futuro do manejo das neoplasias possivelmente será profundamente dependente do uso de biomarcadores que guiarão as decisões médicas em rastreamento, diagnóstico, prognóstico e controle de tratamento e recorrência. Com o uso de biomarcadores, por exemplo, poderemos responder objetivamente a perguntas como: tratar ou não tratar? Operar ou não operar? Cirurgia, radioterapia ou quimioterapia?

A identificação de passos importantes no processo de carcinogênese cervical com certeza nos possibilitará prever o comportamento de lesões cervicais pré-malignas e ainda propor novas modalidades de tratamento para a doença invasora. Entretanto, este processo de investigação é lento e, na grande maioria das vezes, fracionado em achados de diversos centros independentes. Nós, por exemplo, identificamos que c-fms está intimamente relacionado à transformação maligna da cérvix uterina, o que poderá estimular outros centros a comprovar nosso achado e ainda testar o bloqueio deste oncogene em culturas celulares. Adicionalmente, outros centros poderão testar clinicamente o uso de medicações para bloquear c-fms e, assim por diante, num processo contínuo de acúmulo de informações até que se tenha um ganho real para a paciente.

Embora poucos marcadores tenham chegado efetivamente ao uso clínico nos últimos anos, recentes avanços tecnológicos nos têm possibilitado acelerar este processo de descobrimento. Adicionalmente, em vista da complexidade do tecido tumoral, é

improvável que apenas um biomarcador terá a sensibilidade e especificidade necessária para melhor o rastreamento e prognóstico das lesões precursoras. A combinação de um painel de marcadores parece ser uma alternativa para isso.

Apesar do grande esforço de diversos autores, o descobrimento de um marcador perfeito (ou uma combinação deles) ainda está longe de ser alcançado. Em lesões invasoras, por exemplo, o valor preditivo do estadiamento clínico pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*, FIGO) ainda é o melhor prognóstico a ser tomado para as pacientes e poucos marcadores mostram valor independente quando realizadas análises multivariadas.

Em relação a este autor, outros projetos estão em desenvolvimento em carcinogênese cervical, mas que não foram incluídos nesta tese pois ainda não foram concluídos: estudo de aromatase, estudo de ativina IA e IIB e seus respectivos receptores, estudo de fator transformador de crescimento $\beta 1$ e receptores 1 e 2, estudo de mesotelina, além de um projeto de análise de envelhecimento de lâminas para imunohistoquímica no qual compara-se diferentes modalidades de preservação de lâminas. Com certeza, mais cinco publicações científicas serão derivadas destes projetos em andamento.

Apesar de já ter sido descoberto o agente fundamental para o câncer de colo uterino, o HPV, e ainda criarmos uma vacina comprovadamente efetiva contra ele, ainda teremos muitas décadas pela frente, senão séculos, para controlar esta epidemia. Nesse ínterim, muitas pacientes receberão tratamentos desnecessários, muitos receberão tratamentos ineficazes e, o que é pior, milhões ainda morrerão da doença. É urgente que se desvende o processo de carcinogênese cervical para revertermos este quadro. Nosso entendimento chegou até a interação do HPV com o genoma cervical, agora temos o desafio de compreender o que ocorre após.

Apesar dos resultados restritos até então, não há dúvida que a compreensão das diferentes etapas do processo transformação maligna da cérvix uterina é de imenso valor. E esta compreensão começa com a realização de estudos por grupos independentes que, quando em conjunto, terão significado para nossas pacientes.

13. ANEXOS

13.1. Fator de crescimento endotelial vascular

13.1.1. Protocolo

A) Corte

- Cortar em 4 μ m
- Montar em água deionizada a 40°C em lâminas com carga positiva
- Secar por 24 horas

B) Remoção de parafina

- 20 minutos em forno a 60°C
- 10 minutos em xilol + 10 minutos em xilol + 10 minutos em xilol
- 2 minutos em etanol 100%+ 2 minutos em etanol 100%
- 30 imersões em etanol 95%
- 1 minuto em etanol 95%
- 1 minuto em água destilada + 1 minuto em água destilada + 1 minuto em água destilada

C) Recuperação de epítipo

- Colocar em jarra plástica pré-aquecida com 1mM EDTA e ferver por 20 minutos em banho-maria
- Esfriar por 20 minutos ainda em EDTA
- Lavar em solução salina tamponada fosfatada (phosphate buffered saline, PBS) por 1 minuto, duas trocas

D) Montagem em Sequenza

- Montar lâminas em bandeja semi-automática para IHC (Sequenza) utilizando PBS
- Lavar por 5 minutos com PBS em Sequenza (equivale a 20 lavagens manuais)

E) Bloquear peroxidase endógena e biotina

- Aplicar Bloqueador Peróxido de Hidrogênio (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA) por 12 minutos, 100 μ l, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos
- Aplicar Bloqueador Ultra-V (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA) , 100 μ l , por 5 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

F) Aplicar anticorpo primário

- Anticorpo coelho anti-VEGF humano (reage com aminoácidos variantes 121, 165 e 189; cat #RB-9031; Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA)
- Diluição em Diluente Primário (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), diluição 1:150, 100 μ l, por 40 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

G) Aplicar anticorpo secundário ligado à biotina

- Anticorpo cabra anti-coelho (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), 100 μ l, por 30 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

H) Aplicar peroxidase-streptavidina

- Peroxidase-streptavidina (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), 100 μ l, por 10 minutos, em temperatura ambiente

- Lavar com PBS por 5 minutos

I) Coloração com DAB

- Preparar DAB Plus com 1 gota de substrato em 2 ml de diluente (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA)
- Aplicar 500µl, por 5 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

G) Contracoloração

- Remover lâminas de Sequenza
- Dispor lâminas em verde de metila por 5 minutos
- Lavar após por 2 minutos em água deionizada até que não haja corante em excesso

H) Desidratação de lâminas e montagem

- 10 imersões em etanol 95% + 10 imersões em etanol 95%
- 10 imersões em etanol 100% + 10 imersões em etanol 100%
- 30 imersões em xilol
- 30 imersões em xilol
- montar lâminas com resina

13.1.2. Descrição técnica do anticorpo primário

DATA SHEET

Rev 100405D

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Epitope Specific Rabbit Antibody

Cat. #RB-9031-P0, -P1, or -P (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml at 200µg/ml) (Purified Ab with BSA and Azide)

Cat. #RB-9031-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)

Cat. #RB-9031-PCS (5 Slides) (Positive Control for Histology)

Description:

VEGF (vascular endothelial growth factor) is a homodimeric, disulfide-linked glycoprotein involved in angiogenesis which promotes tumor progression and metastasis. This antibody reacts with the 165, 189 and 121 amino acid splice variants of VEGF of human, to a lesser extent, mouse and rat.

Comments: This antibody is excellent for staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Mol. Wt. of Antigen: 19-22kDa (reduced)

Epitope: N-terminus

Species Reactivity: Human. Others not tested.

Immunogen:

A synthetic peptide derived from N-terminal of human VEGF

Applications and Suggested Dilutions:

- Western Blotting (Ab 1µg/ml for 2 hours at RT)
- Immunoprecipitation
- Immunohistology (Formalin/paraffin)

(Ab 1:100 for 30 min at RT with LV's UltraVision)

* [Staining of formalin-fixed tissues requires boiling tissue sections in 1mM EDTA, pH 8.0 for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.]

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Positive Control: Angiosarcoma

Cellular Localization: Cytoplasmic, cell surface, and extracellular matrix

Storage and Stability:

Store vial at 4°C. When stored at 2-8°C, this antibody is stable for 24 months.

Supplied As:

Affinity purified antibody fraction from rabbit anti-serum. Prepared in 10mM PBS, pH 7.6, with 0.2% BSA and 15mM sodium azide.

or

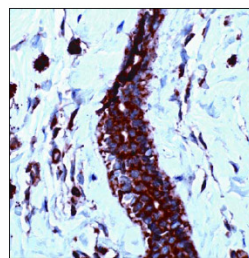
Prediluted antibody which is ready-to-use for immunohistochemical staining.

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.



Human angiosarcoma stained with anti-VEGF, Cat# RB-9031-P

For Research Use Only

47790 Westinghouse Dr. Fremont CA 94539 USA
Tel: (800) 828-1628 Fax: (510) 991-2826
Email: labvision@labvision.com Website: www.labvision.com

LAB VISION
CORPORATION

13.2. Receptor de fator estimulador de colônia de macrófagos

13.2.1. Protocolo

A) Corte

- Cortar em 4µm
- Montar em água deionizada a 40°C em lâminas com carga positiva
- Secar por 24 horas

B) Remoção de parafina

- 20 minutos em forno a 60°C
- 10 minutos em xilol + 10 minutos em xilol + 10 minutos em xilol
- 2 minutos em etanol 100%+ 2 minutos em etanol 100%
- 30 imersões em etanol 95%
- 1 minuto em etanol 95%
- 1 minuto em água destilada + 1 minuto em água destilada + 1 minuto em água destilada

C) Montagem em Sequenza

- Montar lâminas em bandeja semi-automática para IHC (Sequenza) utilizando PBS
- Lavar por 5 minutos com PBS em Sequenza (equivale a 20 lavagens manuais)

D) Bloquear peroxidase endógena e biotina

- Aplicar Bloqueador Peróxido de Hidrogênio (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA) por 12 minutos, 100µl, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos
- Aplicar Bloqueador Ultra-V (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA) , 100µl , por 5 minutos, em temperatura ambiente

- Lavar com PBS por 5 minutos

E) Aplicar anticorpo primário

- Anticorpo policlonal de coelho anti-c-fms humano (cat #CBL776; Chemicon International; Temecula, CA, USA)
- Diluição em Diluente Primário (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), diluição 1:50, 100µl, por 12 horas, 4°C
- Lavar com PBS por 5 minutos

G) Aplicar anticorpo secundário ligado à biotina

- Anticorpo cabra anti-coelho (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), 100µl, por 30 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

H) Aplicar peroxidase-streptavidina

- Peroxidase-streptavidina (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), 100µl, por 10 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

I) Coloração com DAB

- Preparar DAB Plus com 1 gota de substrato em 2 ml de diluente (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA)
- Aplicar 500µl, por 5 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

G) Contracoloração

- Remover lâminas de Sequenza

- Dispor lâminas em verde de metila por 5 minutos
- Lavar após por 2 minutos em água deionizada até que não haja corante em excesso

H) Desidratação de lâminas e montagem

- 10 imersões em etanol 95% + 10 imersões em etanol 95%
- 10 imersões em etanol 100% + 10 imersões em etanol 100%
- 30 imersões em xilol
- 30 imersões em xilol
- montar lâminas com resina

13.2.2. Descrição técnica do anticorpo primário

RABBIT ANTI-HUMAN c-fms ONCOPROTEIN POLYCLONAL ANTIBODY

CATALOG NUMBER:	CBL776	LOT NUMBER:	
QUANTITY:	100 µg		
ALTERNATE NAMES:	c-fms; CD115		
SPECIFICITY:	The purified antibody has been used to detect c-fms oncoprotein in formalin fixed paraffin wax embedded tissue sections. KNOWN SPECIES CROSS REACTIVITY: Known to detect c-fms on either fresh frozen or formalin fixed mouse macrophages.		
APPLICATIONS:	Immunocytochemistry Optimal working dilutions must be determined by the end user.		
SPECIES REACTIVITY:	Reacts with Human and Mouse. Reactivity with other species has not been determined.		
IMMUNOGEN:	Synthetic peptide: Ser-Leu-Pro-Arg-Leu-Lys-Arg-Ser-Glu-Ser-Gly-Arg-Tyr selected from the external domain of the feline v-fms sequence (amino acids 399-411).		
FORMAT:	Purified immunoglobulin, purified by Protein A affinity chromatography		
PRESENTATION:	The purified immunoglobulin is presented at a concentration of 100µg/ml in phosphate buffered saline containing 10mM sodium azide. We recommend that each laboratory determine an optimum working titre for use in its particular application.		
STORAGE/HANDLING:	For use within 1 month of purchase store at +4°C, for long term storage aliquot antibody into small volumes and store at -20°C.		

For research use only; not for use as a diagnostic

Important Note: During shipment, small volumes of product will occasionally become entrapped in the seal of the product vial. For products with volumes of 200 µL or less, we recommend gently tapping the vial on a hard surface or briefly centrifuging the vial in a tabletop centrifuge to dislodge any liquid in the container's cap.

©2002-2003 CHEMICON® International, Inc. - By CHEMICON® International, Inc. All rights reserved. No part of these works may be reproduced in any form without permission in writing.

USA & Canada · Phone: +1(800) 437-7500 · Fax: +1(909) 676-9209 · Europe +44 (0) 23 8026 2233
Australia +61 3 9839 2000 · Germany +49-6192-207300 · ISO Registered worldwide
www.chemicon.com · custserv@chemicon.com · techserv@chemicon.com

13.3. Ciclooxigenase-2

13.3.1. Protocolo

A) Corte

- Cortar em 4µm
- Montar em água deionizada a 40°C em lâminas com carga positiva
- Secar por 24 horas

B) Remoção de parafina

- 20 minutos em forno a 60°C
- 10 minutos em xilol + 10 minutos em xilol + 10 minutos em xilol
- 2 minutos em etanol 100%+ 2 minutos em etanol 100%
- 30 imersões em etanol 95%
- 1 minuto em etanol 95%
- 1 minuto em água destilada + 1 minuto em água destilada + 1 minuto em água destilada

C) Recuperação de epítipo

- Colocar em jarra plástica pré-aquecida com solução tampão de citrato, pH 6.0, e ferver por 20 minutos em banho-maria
- Esfriar por 20 minutos ainda em citrato.
- Lavar em solução salina tamponada fosfatada (phosphate buffered saline, PBS) por 1 minuto, duas trocas

D) Montagem em Sequenza

- Montar lâminas em bandeja semi-automática para IHC (Sequenza) utilizando PBS
- Lavar por 5 minutos com PBS em Sequenza (equivale a 20 lavagens manuais)

E) Bloquear peroxidase endógena e biotina

- Aplicar Bloqueador Peróxido de Hidrogênio (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA) por 12 minutos, 100µl, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos
- Aplicar Bloqueador Ultra-V (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA) , 100µl , por 5 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

F) Aplicar anticorpo primário

- Anticorpo coelho anti-COX-2 humano (cat #RB-9072; Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA)
- Diluição em Diluente Primário (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), diluição 1:150, 100µl, por 30 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

G) Aplicar anticorpo secundário ligado à biotina

- Anticorpo cabra anti-coelho (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), 100µl, por 30 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

H) Aplicar peroxidase-streptavidina

- Peroxidase-streptavidina (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), 100µl, por 10 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

I) Coloração com DAB

- Preparar DAB Plus com 1 gota de substrato em 2 ml de diluente (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA)
- Aplicar 500µl, por 5 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

G) Contracoloração

- Remover lâminas de Sequenza
- Dispor lâminas em verde de metila por 5 minutos
- Lavar após por 2 minutos em água deionizada até que não haja corante em excesso

H) Desidratação de lâminas e montagem

- 10 imersões em etanol 95% + 10 imersões em etanol 95%
- 10 imersões em etanol 100% + 10 imersões em etanol 100%
- 30 imersões em xilol
- 30 imersões em xilol
- montar lâminas com resina

13.3.2. Descrição técnica do anticorpo primário

DATA SHEET

Rev 121004E

COX2

Epitope Specific Rabbit Antibody

Cat. #RB-9072-P0, -P1, or -P (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml at 200µg/ml) (Purified Ab with BSA and Azide)

Cat. #RB-9072-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)

Cat. #RB-9072-PCS (5 Slides) (Positive Control for Histology)

Cat. #RB-9072-PCL (0.1ml) (Positive Control for Western Blot)

Description:

COX2 (Cyclooxygenase-2) is an inducible enzyme. It is involved in the response of cells to growth factors, tumor promoters, and cytokines that induce its expression. Given its role in synthesizing prostaglandins, COX2 is therefore of interest in studying immune response regulation. COX2 is induced by a wide variety of stimuli and was initially identified as immediate-early growth response gene. In addition, COX2 expression markedly increased in 85-90% of human colorectal adenocarcinoma whereas COX1 levels remain unchanged.

Comments: This antibody is excellent for staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Mol. Wt. of Antigen: 70kDa

Epitope: C-terminus

Species Reactivity: Human, mouse, and rat. Others not tested.

Immunogen: Synthetic peptide corresponding to c-terminus of rat COX2.

Applications and Suggested Dilutions:

- Western Blotting (Ab 2-4µg/ml for 2hrs at RT)
- Immunoprecipitation
- Immunohistology (Formalin/paraffin)

(Ab at 1:200 for 30 min with LV's UltraVision)

* [Staining of formalin-fixed tissues requires boiling tissue sections in 10mM citrate buffer, pH 6.0 for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.]

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Positive Control: HT29 cells, Lung and colon carcinoma

Cellular Localization: Cytoplasmic and membrane

Storage and Stability:

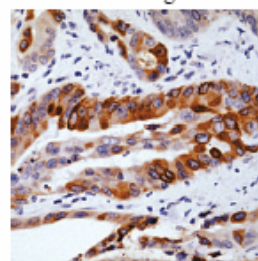
Store vial at 4°C. When stored at 2-8°C, this antibody is stable for 24 months.

Supplied As:

Affinity purified antibody fraction from rabbit anti-serum. Prepared in 10mM PBS, pH 7.6, with 0.2% BSA and 15mM sodium azide.

or

Prediluted antibody which is ready-to-use for immunohistochemical staining.



Colon carcinoma stained with anti-COX2, Cat# RB-9072-P

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only

47790 Westinghouse Dr. Fremont CA 94539 USA
Tel: (800) 828-1628 Fax: (510) 991-2826
Email: labvision@labvision.com Website: www.labvision.com



13.4. CD68

13.4.1. Protocolo

A) Corte

- Cortar em 4µm
- Montar em água deionizada a 40°C em lâminas com carga positiva
- Secar por 24 horas

B) Remoção de parafina

- 20 minutos em forno a 60°C
- 10 minutos em xilol + 10 minutos em xilol + 10 minutos em xilol
- 2 minutos em etanol 100%+ 2 minutos em etanol 100%
- 30 imersões em etanol 95%
- 1 minuto em etanol 95%
- 1 minuto em água destilada + 1 minuto em água destilada + 1 minuto em água destilada

C) Recuperação de epítipo

- Colocar em jarra plástica pré-aquecida com solução tampão de citrato, pH 6.0, e ferver por 20 minutos em banho-maria
- Esfriar por 20 minutos ainda em citrato.
- Lavar em solução salina tamponada fosfatada (phosphate buffered saline, PBS) por 1 minuto, duas trocas

D) Montagem em Sequenza

- Montar lâminas em bandeja semi-automática para IHC (Sequenza) utilizando PBS
- Lavar por 5 minutos com PBS em Sequenza (equivale a 20 lavagens manuais)

E) Bloquear peroxidase endógena e biotina

- Aplicar Bloqueador Peróxido de Hidrogênio (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA) por 12 minutos, 100µl, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos
- Aplicar Bloqueador Ultra-V (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA) , 100µl , por 5 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

F) Aplicar anticorpo primário

- Anticorpo rato anti-CD68 humano (cat. #MS-1808-S; Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA)
- Diluição em Diluente Primário (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), diluição 1:100, 100µl, por 30 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

G) Aplicar anticorpo secundário ligado à biotina

- Anticorpo cabra anti-rato (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), 100µl, por 30 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

H) Aplicar peroxidase-streptavidina

- Peroxidase-streptavidina (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA), 100µl, por 10 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

I) Coloração com DAB

- Preparar DAB Plus com 1 gota de substrato em 2 ml de diluente (Labvision Corporation; Fremont, CA, EUA)
- Aplicar 500µl, por 5 minutos, em temperatura ambiente
- Lavar com PBS por 5 minutos

G) Contracoloração

- Remover lâminas de Sequenza
- Dispor lâminas em verde de metila por 5 minutos
- Lavar após por 2 minutos em água deionizada até que não haja corante em excesso

H) Desidratação de lâminas e montagem

- 10 imersões em etanol 95% + 10 imersões em etanol 95%
- 10 imersões em etanol 100% + 10 imersões em etanol 100%
- 30 imersões em xilol
- 30 imersões em xilol
- montar lâminas com resina

13.4.2 Descrição técnica do anticorpo primário



DATA SHEET
Rev 012003A

CD68 (Macrophage Marker) Ab-4 (Clone PG-M1)

Mouse Monoclonal Antibody

Cat. #MS-1808-S0, -S1, or -S (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml Supernatant)

Cat. #MS-1808-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)

Cat. #MS-1808-PCS (5 Slides) (Positive Control for Histology)

Description: CD68 glycoprotein is expressed on macrophages and monocytes.

Comments: Ab-4 is important for identifying macrophages in tissue sections. It stains macrophages in a wide variety of human tissues, including Kupffer cells and macrophages in the red pulp of the spleen, in lamina propria of the gut, in lung alveoli, and in bone marrow. Ab- does not react with APCs, follicular dendritic cells, interdigitating cells, myeloid precursors and peripheral blood granulocytes. It also reacts with plasmacytoid T cells which are supposed to be of monocyte/macrophage origin. It shows strong granular cytoplasmic staining of chronic and acute myeloid leukemia and also reacts with rare cases of true histiocytic neoplasia. Tumors of lymphoid origin are usually not stained.

Mol. Wt. of Antigen: 110kDa

Epitope: Not determined

Species Reactivity: Human. Others not tested.

Clone Designation: PG-M1

Ig Isotype / Light Chain: IgG₃ / κ

Immunogen: Gaucher cells

Applications and Suggested Dilutions:

- Immunohistology (formalin/paraffin) (Ab 1:50-1:100 for 30 min at RT)
- * [Staining of formalin-fixed tissues REQUIRES boiling tissue sections in 10mM citrate buffer, pH 6.0, (NEOMARKERS' Cat. #AP-9003), for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.]

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Positive Control: Tonsil

Cellular Localization: Cytoplasmic

Storage and Stability:

Store vial at 4°C. When stored at 2-8°C, this antibody is stable for 24 months.

Supplied As:

Tissue culture supernatant with 0.09% sodium azide, or
Prediluted antibody which is ready-to-use for staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Key References:

1. Fallini B, et al. (1993) Am J Pathol, 142:1359.
2. Horny H P, et al. (1992) Hum Pathol, 24:355.

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only

47777 Warm Springs Blvd, Fremont CA 94539 USA
Tel: (800) 828-1628 Fax: (510) 991-2826
Email: labvision@labvision.com Website: www.labvision.com



13.5. Termo de consentimento estudo LAMS

MELHORIA DA QUALIDADE DOS PROGRAMAS DE CONTROLE DE CÂNCER DE COLO DO ÚTERO NA AMÉRICA LATINA - LAMS – Latin American Screening Study - INCO-DEV.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Prezada paciente,

Você está fazendo parte de um projeto em que buscamos avaliar qual o melhor método de rastreamento para câncer de colo uterino e qual a maneira mais adequada para seguimento, mas antes de falarmos sobre o projeto, gostaríamos de lhe explicar um pouco mais sobre o câncer de colo uterino.

Por que falamos de câncer de colo uterino?

O câncer de colo uterino é um dos tipos de câncer que mais mata no Brasil. Em algumas regiões, ele ocupa o primeiro lugar. Mas ele possui uma particularidade: antes de tornar-se uma doença maligna, ele apresenta lesões precursoras, isto é, lesões que ainda não são câncer mas que poderão se tornar. E como temos acesso ao colo uterino no exame ginecológico, podemos detectar estas lesões precursoras antes de chegarem ao estado de câncer e assim tratá-las.

Quais são as lesões precursoras?

Sabemos que a grande maioria dos casos de câncer de colo uterino está ligada à presença de um vírus no colo uterino, o chamado HPV (Papilomavírus Humano). Este vírus é de transmissão sexual e causa lesões que são classificadas em ordem crescente de gravidade:

NIC I – chamamos de NIC I aquela lesão inicial, que é a primeira a se manifestar;

NIC II – são aquelas lesões moderadas, que estão no meio do caminho entre inicial e grave;

NIC III – lesão avançada, que na grande maioria das vezes poderá progredir para câncer de colo uterino.

Como procurar estas lesões?

Existem várias maneiras de identificar estas lesões. Vamos aqui lhe falar sobre as três que realizamos em nosso ambulatório:

- 1) Exame de Papanicolau (também conhecido como “citopatológico de colo uterino” ou “preventivo”) – é o exame que a maioria das mulheres realiza em consultórios médicos, quando é coletado material do colo do útero e analisado em laboratório, para ver se não existem alterações em suas células.
- 2) Inspeção de colo de útero – neste exame, aplicamos dois líquidos reagentes sobre o colo do útero; caso exista alguma lesão no colo, estes líquidos tornam esta lesão mais aparente permitindo ao médico identificá-la.
- 3) Pesquisa do HPV (também conhecida como “hibridização”) – este exame procura identificar a presença do vírus HPV pois, como falamos antes, ele está associado a lesões precursoras e ao próprio câncer de colo uterino; neste exame coletamos material do colo uterino e realizamos a pesquisa do HPV; este exame não costuma ser realizado normalmente em ambulatórios pelo seu custo.

Se algum exame for alterado, o que fazer?

Em primeiro lugar, os testes anteriores eram apenas de rastreio. Ou seja, identificam apenas as mulheres que possuem risco de terem alguma lesão. Se algum teste destes (exame de Papanicolau, inspeção de colo de útero ou pesquisa do HPV) der positivo, a paciente realizará um exame confirmatório chamado COLPOSCOPIA. A colposcopia é o exame do colo uterino através de potentes lentes de aumento que confirmará ou não as lesões. Na presença de alguma lesão suspeita, é realizada a biópsia do local alterado e, com esta amostra, temos o diagnóstico definitivo na maioria dos casos.

O que é o projeto em que você está fazendo parte?

Trata-se de um projeto dividido em duas partes. Na primeira parte, que será executada durante um ano, estaremos rastreando cerca de 3000 mulheres para câncer de colo uterino ou lesões precursoras. Para sabermos se você possui alguma lesão, serão oferecido o exame de Papanicolau e inspeção de colo uterino. Para algumas pacientes também será oferecida a pesquisa do HPV. As pacientes que possuírem exames normais receberão alta do nosso ambulatório no primeiro ano, sendo orientadas a fazer a revisão ginecológica e o exame de Papanicolau anualmente. A segunda parte do projeto inclui as pacientes que apresentarem exames alterados neste rastreamento. Estas serão tratadas e observadas por mais dois anos em nosso ambulatório de pesquisa, após, serão encaminhadas ao ambulatório normal da ginecologia do

Hospital de Clínicas de Porto Alegre ou, se necessário, a outro centro especializado de atendimento. Este acompanhamento será de acordo com modelos médicos aceitos mundialmente. Não estaremos submetendo você a nenhum procedimento diferente ou experimental.

Qual o sigilo da pesquisa?

Os dados coletados nesta pesquisa são de interesse médico e em nenhum momento seu nome será revelado a outras pessoas que não fazem parte de nosso grupo. Quando os dados forem apresentados em revistas e jornais médicos, sua identidade será mantida no sigilo.

Sinta-se à vontade para decidir sobre sua participação. Caso não deseje participar, em nenhum momento isto prejudicará seu atendimento futuro neste hospital. Caso deseje participar, assine abaixo. Desde já, grato pela atenção.

Assinatura: _____ Data: _____

Responsável pelo termo:

Assinatura: _____ Data: _____

Paciente:

Assinatura: _____ Data: _____

Responsável (se menor que 18 anos):

Pesquisador responsável: Dr. Paulo Naud - Telefone para contato: 3316.8703

* ENTREGAR UMA VIA À PACIENTE

13.6. Termo de consentimento estudo Biomarcadores

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - ASSOCIAÇÃO DE BIOMARCADORES A LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E RISCO DE PROGRESSÃO

Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação - Projeto nro 05-154

Prezada paciente,

Você faz parte do projeto “Melhoria da Qualidade dos Programas de Controle de Câncer de Colo do Útero na América Latina” no qual realizou exames para rastreamento para câncer de colo uterino e lesões precursoras.

Estes exames eram:

- citopatológico de colo uterino (também conhecido como exame preventivo ou Papanicolau)
- inspeção do colo uterino
- captura híbrida para Papilomavírus Humano

Na presença de qualquer alteração nesses exames, você realizou colposcopia, que é um exame no qual inspecionamos o colo uterino com uma lente de aumento. Como você apresentou alteração na colposcopia, realizamos uma biópsia, que é a retirada de uma pequena porção do colo uterino para ser examinada em laboratório através de microscópio (exame histológico). O exame histológico é que nos fornece o diagnóstico definitivo das alterações em colo uterino, dizendo se realmente o que vimos na colposcopia era lesão ou simplesmente alteração de coloração sem significado maior.

Em alguns casos, algumas pacientes necessitaram realizar a cirurgia de conização para retirada de uma porção de colo uterino maior devido a lesões acentuadas ou até mesmo a retirada total do útero (histerectomia). Em qualquer destes tipos de cirurgia, o material obtido era também examinado em laboratório através de microscópio, ou seja, era submetido ao exame histológico para examinar se a lesão não era de um grau mais acentuado do que a diagnosticada na biópsia. Todos estes procedimentos descritos são de rotina médica e você não foi submetida a nenhuma metodologia experimental.

Para realizar o exame histológico geralmente analisamos apenas uma pequena porção do material obtido nas biópsias, conizações e histerectomias. O restante é mantido em arquivo em pequenos blocos feitos de

parafina. Algumas vezes, quando temos dúvida em determinado diagnóstico histológico, pedimos imediatamente para que o médico patologista (que trabalha no laboratório) revise o bloco. Isso ocorre sempre alguns dias depois de recebermos o diagnóstico. Se possuíamos alguma dúvida em seu diagnóstico, este procedimento já foi realizado.

Quando não temos dúvida no diagnóstico, o que ocorre na maioria das vezes, o bloco de parafina é mantido em arquivo durante alguns anos e, depois, descartado no lixo hospitalar, pois não tem mais utilidade.

O que estamos solicitando a você é a autorização para utilização dos blocos de parafina de biópsias e/ou conização e/ou histerectomia que você realizou para serem estudados em outro projeto intitulado “ASSOCIAÇÃO DE BIOMARCADORES A LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E RISCO DE PROGRESSÃO”. Estas amostras serão testadas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas em San Antonio, Estados Unidos, em cooperação com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Como é este estudo?

Sabemos que a grande maioria das lesões pré-malignas de colo uterino não progredirá para lesões mais acentuadas ou até mesmo para câncer. Entretanto, nos dias de hoje, não dispomos de nenhum fator prognóstico claro para estabelecer qual lesão irá progredir e qual não irá progredir. Assim, acabamos por realizar tratamentos desnecessários em lesões que nunca progrediriam para casos mais graves ou até mesmo iriam regredir espontaneamente.

Alguns estudos têm sugerido o uso de biomarcadores em material proveniente de biópsias, conizações ou histerectomias para estabelecer o prognóstico. Estes biomarcadores são substâncias que podem indicar quais lesões tem mais risco de progredir para câncer de colo e quais tem menos risco de progressão. Desta maneira, poderíamos prever o futuro das alterações de colo uterino e assim prevenir tratamentos desnecessários.

No seu caso, como em todas as outras pacientes atendidas pelos recursos que dispomos na medicina atual, acabamos realizando tratamento pois ainda não temos estes biomarcadores para uso clínico.

Desta maneira, estamos solicitando a você autorização de aplicar estes biomarcadores aos blocos de parafina de material proveniente dos procedimentos que você realizou. O material que estamos utilizando é excedente, ou seja, foi utilizado para o seu diagnóstico no passado e agora não possui mais utilidade para você, já que o seu diagnóstico foi firmado e o tratamento já estabelecido. Caso seja necessária no futuro uma

revisão deste material, o que é uma suposição remota, esta poderá ser dificultada em parte pois os blocos foram testados para os biomarcadores, mas poderá ser realizada pois o material retornará dos Estados Unidos dentro de um ano.

Você não terá nenhuma vantagem direta em ceder suas amostras para o projeto porque já realizou tratamento para as lesões de colo uterino que possuía (retirada da lesão do colo uterino). Na verdade, você poderá estar ajudando outras pessoas no futuro para que o tratamento das lesões de colo uterino seja mais objetivo e que os fatores prognósticos sejam mais claros.

Seu nome ou informações que venham a identificar você em nenhum momento serão revelados e garantiremos seu anonimato em publicações científicas que venhamos a realizar.

Caso tenha qualquer dúvida sobre o que foi escrito, por favor sinta-se à vontade de discutir e questionar o médico que está lhe oferecendo participação neste estudo. Dúvidas posteriores poderão ser esclarecidas com um membro da equipe – fone para contato: 2101.8703 - Médico responsável: Dr. João Sabino L. da Cunha Filho ou Dr. Luciano Hammes.

Caso você não deseje permitir o estudo nos blocos de parafina referentes ao seu diagnóstico/tratamento, em nenhum momento seu atendimento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre será influenciado. Além disso, mesmo após ter assinado este documento, você poderá desistir da autorização antes da testagem do material.

Se você deseja autorizar o uso dos seus blocos de parafina para o estudo, por favor assine abaixo e coloque a data de hoje.

Nome da participante (letra de forma): _____

Assinatura da participante: _____ Data: _____

Nome do médico responsável pelo termo de consentimento (em letra de forma): _____

Assinatura do médico: _____ Data: _____