

# Associação entre a expressão de p16 e neoplasia intra-epitelial cervical

## *Association between p16 expression and cervical intraepithelial neoplasia*

Patrícia T.K. Yonamine<sup>1</sup>; Melissa S.G. Junqueira<sup>1</sup>; Juliana O. Rodrigues<sup>1</sup>; Sabrina F. Pereira<sup>1</sup>; Thiago Pandossio<sup>1</sup>; Damaris A. Rodrigues<sup>2</sup>; Juliana F. Pedregosa<sup>2</sup>; Natália G. Munhoz<sup>3</sup>; José Antonio Cordeiro<sup>4</sup>; Patrícia Maluf Cury<sup>5</sup>; Jane Lopes Bonilha<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos\*; <sup>2</sup>Enfermeiras\*; <sup>3</sup>Mestranda\*; <sup>4</sup>Professor Doutor do Depto Epimemiologia e Saúde Coletiva\*; <sup>5</sup>Professora Doutora do Depto Patologia e Medicina Legal\*

\* Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

**Resumo** **Introdução:** Com aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo, o câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano. Por meio de métodos imunohistoquímicos é possível evidenciar genes como o p16, envolvido diretamente na carcinogênese. **Objetivo:** Verificar a associação da expressão de proteína p16 em neoplasia intra-epitelial cervical (CIN) e prognóstico, relação com a persistência e graduação da lesão. **Materiais e métodos:** Neste estudo experimental, foram selecionadas 13 biópsias com CIN, de mulheres que, uma vez tratadas, permanecem livres de manifestação da doença há, no mínimo, 36 meses após o diagnóstico inicial. O grupo de estudo conta com 21 biópsias com CIN ou carcinoma invasor e que, mesmo tratadas, mantêm manifestação da CIN há pelo menos 4 anos. Utilizamos um biomarcador para a proteína p16, através de técnica imunohistoquímica e contamos as células marcadas. A seguir, verificamos o índice entre o número de células imunocoradas dentre as células contadas em cada caso. Para o estudo estatístico, foi utilizado o teste Análise de Variância para Medidas repetidas. **Resultados:** Não há diferença na expressão deste marcador quanto à persistência da lesão ( $p=0,5024$ ); ele marca de maneira diferenciada os casos de CIN III e de carcinoma espinocelular invasivo do colo do útero e, com menor intensidade, as CIN I ( $p=0,00000007$ ), sendo  $p$  significativo quando menor que 0,005. Verificamos que, quanto ao diagnóstico, o marcador para proteína p16 mostra-se altamente eficaz, marcando de maneira diferenciada os núcleos e citoplasmas de células dos casos de CIN III e, com menor intensidade, os de CIN I.

**Palavras-chave** Genes p16, Papilomavírus Humano, Colo do Útero, Neoplasia Intra-Epitelial Cervical.

**Abstract** **Introduction:** With approximately 500,000 new cases worldwide each year, uterine cervical neoplasm is the second most common type of cancer among women. It is responsible for about 230,000 deaths yearly. By immunohistochemical methods, it is possible to reveal genes such as p16, which is directly involved in carcinogenesis. **Objective:** To study the association of p16 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and prognosis compared with persistence and degree of injury. **Materials and methods:** In this experimental study, 13 biopsies with CIN were selected. All the biopsies were from women who have been treated and are now free of signs and symptoms of the disease for at least 36 months after the initial diagnosis. The study group consists of 21 biopsies from women with CIN or invasive carcinoma and that, even treated, remain with signs and symptoms of CIN for at least 4 years. We used a biomarker for protein p16 and an immunohistochemistry technique, and we counted the labelled cells as well. Then, we have checked the ratio of the amount of immuno stained cells to the cells counted in each case. We used the repeated-measures analysis of variance to analyze data. **Results:** There is no difference in the expression of this marker as for the persistence of the lesion ( $p = 0.5024$ ); it makes a mark differently in cases of CIN III and invasive spindle cell carcinoma of the uterine cervix, and to a lesser extent, in cases of the CIN I ( $p = 0.00000007$ ). We considered  $p < 0.005$  as statistically significant. We note that regarding the diagnosis, the marker for protein p16 appears to be highly effective, marking differently nuclei and cytoplasm of cells of all cases of CIN III and, to a lesser extent, those of CIN I.

**Keywords** Genes, p16, Human Papillomavirus, Cervix Uteri, Cervical Intraepithelial Neoplasia.

## Introdução

O número de casos novos de câncer do colo do útero esperados para o Brasil no ano de 2008 é de 18.680, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres. Com aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo, o câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos comparado com os mais desenvolvidos. A incidência por câncer do colo do útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. Dessa forma, torna-se de vital importância a realização de exames citopatológicos preventivos.

Sabe-se que alterações no ciclo celular podem ser o início do processo de carcinogênese. O ciclo celular é controlado por genes supressores e estimuladores da proliferação celular<sup>2</sup>. Quando ocorrem mutações, proto-oncogenes tornam-se oncogenes, que são carcinogênicos e causam multiplicação celular excessiva. Os genes supressores, em contraste, contribuem para o desenvolvimento de câncer quando são inativados por mutações. A perda da ação de genes supressores funcionais pode levar a célula ao crescimento inadequado. O ciclo celular também pode ser alterado pela ação de vírus, entre eles o HPV (*Human Papillomavirus*) é de especial interesse na oncogênese cervical<sup>3</sup>.

O gene p16 (*CDKN2/INK4a*), classificado como supressor de tumor, está localizado no cromossomo 9p21 e codifica uma proteína de 16 kDa, que controla negativamente a progressão do ciclo celular nas fases G1/S. Normalmente, o gene p53 através de sua proteína envia sinal para o p16 que é um gene inibidor de CDK/ciclina e há parada do ciclo celular<sup>4</sup>. O gene p16 inibe o grupo de proteínas reguladoras denominadas kinases dependentes de ciclina (*CDK*), as quais inibem ou ativam fases específicas do ciclo celular. Uma das formas de silenciamento deste gene é a hipermetilação, inativando sua transcrição e contribuindo para o desenvolvimento tumoral<sup>5</sup>.

Dessa forma, a presença da proteína p16 expressa a possibilidade de existência de um tumor. Com o uso de métodos imunohistoquímicos é possível avaliar a positividade dessa proteína. Em células do colo do útero, tal positividade está ligada à presença de HPV<sup>6</sup> (*Human Papillomavirus*).

A frequência de expressão de p16 é de 97% em carcinoma de células escamosas do colo do útero<sup>7</sup> e de 80% em adenocarcinoma de colo uterino<sup>8</sup>. O carcinoma de células pequenas de colo de útero é um câncer muito agressivo e com prognóstico ruim; as pacientes sobrevivem apenas de 8,2 a 41 meses. Em um estudo realizado em 10 portadoras desse tipo de câncer, sempre houve positividade para o p16, que frequentemente associava-se ao HPV<sup>9</sup>.

De acordo com os estudos epidemiológicos, o HPV pode ser classificado em: de alto risco, médio risco e de baixo risco. O HPV de alto risco expressa os oncogenes E6 e E7. O oncogene E7 interage com a proteína Rb que regula negativamente a fase S do ciclo celular e leva a produção da proteína p16 e à divisão das células. Dessa forma, a presença de tal proteína pode servir

como marcador para diagnosticar, de forma precoce, o câncer de colo de útero<sup>10</sup>.

A imunohistoquímica com anticorpos para marcar a proteína p16 tem sido muito utilizada nos últimos anos para auxiliar em diagnósticos patológicos. Contudo, tem-se verificado que esse marcador não é nem 100% específico, nem sensível o suficiente para diagnosticar uma lesão<sup>11</sup>. Entretanto, vários estudos vêm detectando a eficiência da imunohistoquímica com marcador para p16, podendo este ser associado ao uso de outros marcadores como o p14, por exemplo<sup>12</sup>.

O p16 tem-se mostrado de especial eficácia quando usado para detectar lesões de alto potencial cancerígeno, como as neoplasias intra-epiteliais cervicais (CIN) de grau II e III. Mas ainda questiona-se o fato de o procedimento ser caro quando comparado a outros métodos diagnósticos<sup>13</sup>. Contudo, há estudo comparando a eficácia do p16 em relação a outros métodos, e, vêm-se concluindo que quando se avalia a existência de HPV de alto risco, o biomarcador para p16 mostra-se superior a outros testes como o de hibridização *in situ*<sup>14</sup> e a investigação da metilação de CpG<sup>14</sup>.

## Objetivo

Verificar a associação da expressão de proteína p16 em neoplasia intra-epitelial cervical e prognóstico, relação com a persistência e graduação da lesão.

## Materiais e métodos

Neste trabalho, experimental prospectivo, estudamos a expressão do p16 em epitélio do colo do útero em dois grupos distintos de pacientes atendidas no Serviço de Anatomia Patológica da FUNFARME/FAMERP (São José do Rio Preto-SP).

Os casos foram selecionados a partir de biópsias de colo do útero com diagnóstico de CIN ou carcinoma invasor, com evidências morfológicas sugestivas de infecção pelo HPV.

No primeiro grupo foram selecionadas 13 biópsias com CIN I, II ou III e carcinoma invasor, em que as mulheres, uma vez tratadas, permanecem livres de manifestação da doença há, no mínimo, 36 meses após o diagnóstico inicial. No segundo grupo foram selecionadas 21 biópsias com CIN I, II ou III e carcinoma invasor e que, mesmo tratadas, mantêm manifestação da doença há pelo menos 4 anos.

O diagnóstico inicial (laudo anátomo-patológico) foi revisado por um segundo patologista e ocorrendo conflito com o diagnóstico inicial, por um terceiro patologista. O material estava processado rotineiramente e corado pela hematoxilina-eosina (H-E).

Para este estudo, utilizamos biomarcador para a proteína p16, através de técnica imunohistoquímica que empregou o *p16<sup>INK4a</sup> kit de anticorpo monoclonal liofilizado de ratinho (clone 6H12, Novocastra, Bentonlane-NewCastle, Upon Time)*, seguindo as recomendações do fabricante.

Neste estudo a imunohistoquímica para a proteína p16 marcou as biópsias de três maneiras: a) Corando núcleos e citoplasmas; b) Corando somente o citoplasma, e c) Corando somente o núcleo.

Em seguida, realizou-se estudo dos casos com microscópio Olympus CX31, biológico, binocular. Com o aumento de quatrocentas vezes, selecionaram-se seis campos de imagens da lesão, por biópsia, ao acaso, que foram capturadas por câmara Samsung SDC-313, modelo DSC-313ND, através do programa informatizado *Image\_Pro Plus 4*.

Fez-se uma análise quantitativa, realizando-se a contagem de células, caso a caso, variando de 182 a 1344 células marcadas pela imunohistoquímica. A seguir, verificou-se a relação entre o número de células que expressavam a proteína p16 dentro as células contadas em cada caso. Para o estudo estatístico, foi utilizado o teste Análise de Variância para Medidas Repetidas.

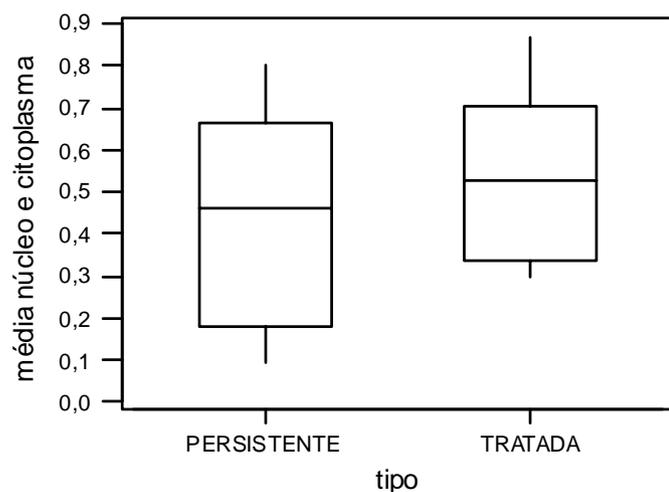
### Resultados

Foram analisadas, ao todo, 45 biópsias, sendo que onze casos foram considerados negativos para a expressão de p16 e não foram incluídos para a análise final do trabalho.

Em a e em b, abaixo, mostramos o resultado da análise de um grupo em relação ao outro (Tratada X Persistente) e depois, em c e em d, de um diagnóstico em relação ao outro (CIN I x CIN II x CIN III).

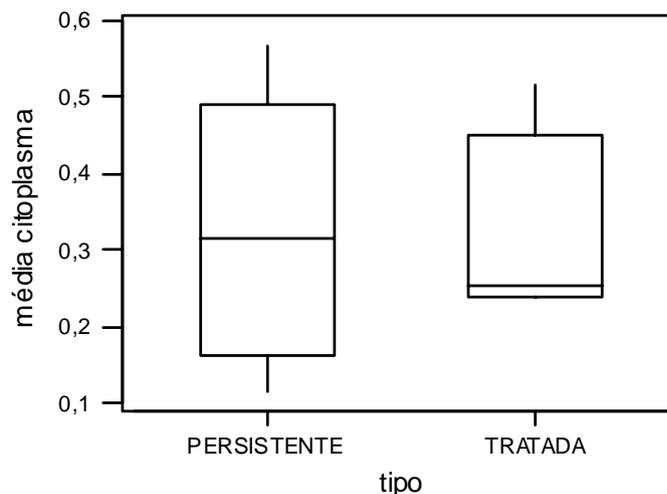
a) A figura 1 mostra os resultados das biópsias com os núcleos e citoplasmas corados: Para o nível de significância de 5% (0,05), obtivemos  $p=0.5024$ . Diante desse valor, concluímos que não existe diferença estatisticamente significativa entre as médias de expressão do marcador para p16 entre os grupos de CIN tratadas e persistentes quando o núcleo e o citoplasma foram corados. A Figura 1 ilustra a distribuição dos dados.

**Figura 1** - gráfico da expressão de p16 no grupo de tratadas e persistentes quando o núcleo e o citoplasma foram corados.



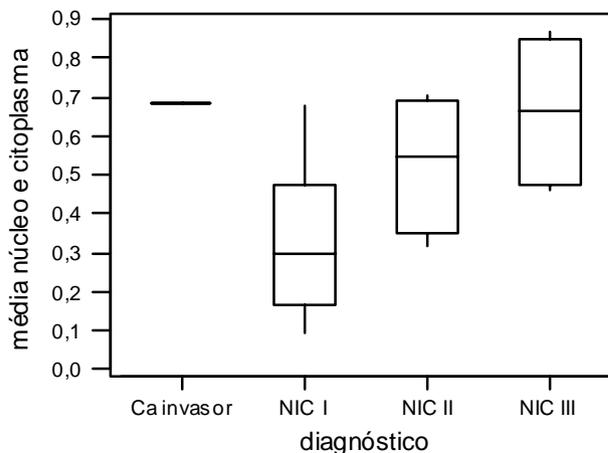
b) A figura 2 mostra biópsias onde foi corado apenas o citoplasma das células: Para o nível de significância de 5% (0,05), obtivemos  $p=0.5024$ . Diante desse valor, concluímos que não existe diferença significativa entre as médias de expressão de p16 no grupo de CIN tratadas e persistentes quando apenas o citoplasma foi corado (Figura 2).

**Figura 2**- gráfico da expressão de p16 no grupo de tratadas e persistentes quando apenas o citoplasma foi corado.



c) A figura 3 mostra a expressão de p16 no núcleo e no citoplasma: Para o nível de significância de 5% (0,05), obtivemos  $p<0.001$ . Observamos que o marcador de p16 expressou-se de maneira diferente entre os diferentes diagnósticos. Através da observação da Figura 3, constatamos que a maior expressão ocorreu nos casos com diagnóstico de CIN III e ocorreu considerável contraste quando comparado aos casos de CIN I.

**Figura 3** - expressão de p16 entre NIC I, NIC II, NIC III e Carcinoma Invasor quando o núcleo e o citoplasma são corados.



Foram observados somente dois casos de núcleos corados pelo marcador p 16.

### Discussão

Neste estudo buscamos diferenciar a expressão do marcador para a proteína p16 em pacientes de dois grupos; as tratadas (aquelas que uma vez tratadas, permanecem livres de manifestação da doença há, no mínimo, 36 meses após o diagnóstico inicial) e aquelas que foram tratadas, mas que mantém manifestações da doença há 4 anos (grupo persistente). Após a avaliação de 13 amostras de biópsias no primeiro grupo

e 21 no segundo grupo, que foi possível concluir que não há diferença na expressão deste marcador, entre os casos de CIN persistentes e livres da doença. Dados de literatura mostram que a imunohistoquímica para p16 parece revelar variações morfológicas leves em possíveis subgrupos biológicos diferentes de CIN, porém não caracterizaram esses subgrupos e, menos ainda, verificaram sua relação com a persistência da CIN<sup>15</sup>.

Assim verificamos que quanto ao diagnóstico, o marcador para proteína p16 mostra-se altamente eficaz, marcando de maneira diferenciada os núcleos e citoplasmas de células dos casos de CIN III e, com menor intensidade, os de CIN I. Concordando com este achado, Volgareva et al. (2004)<sup>16</sup> encontraram super-expressão de proteína p16 em amostras de CIN e carcinomas. Essa expressão aumentou de CIN I para CIN III e carcinoma invasivo. Em outros estudos ficou claro que este marcador cora intensamente os casos com diagnóstico CIN III, expressando-se no núcleo e no citoplasma. Desta forma, nosso estudo encontra-se de acordo com os estudos, que associam a expressão de tal marcador à expressão diferenciada entre os graus de CIN<sup>17,18</sup>.

Um relato de caso mostrou que, ao avaliar uma paciente de 70 anos, infectada por HPV 83, que é um HPV de baixo grau, o marcador para proteína p16 corou intensamente as amostras de biópsia. E, posteriormente desenvolveu-se uma lesão cancerosa<sup>18</sup>. O que revela que o marcador para p16 é eficiente para diferenciar as lesões de alto poder cancerígeno dentre as lesões pré-neoplásicas em colo do útero.

Em outro estudo, foi possível diferenciar um adenocarcinoma de colo de útero de um adenocarcinoma de endométrio com o uso do p16, sugerindo ainda haver especificidade no uso deste biomarcador<sup>19</sup>.

O marcador da proteína p16 também se mostrou útil para diferenciar CIN III, onde foi positivo, de metaplasia escamosa atípica (p16 negativo), quando associado aos marcadores de p63 e citoceratina (CK17)<sup>20</sup>.

Outro estudo confirma a utilidade de imunocitoquímica para p16 combinada com hibridização *in situ* e genotipagem de HPV por PCR como testes molecular-biológicos aplicáveis em espécimes de citologia de base líquida, para identificar as pacientes com risco alto de câncer cervical; a referida associação apresentou sensibilidade alta (89.3%), como também especificidade alta (92.6%)<sup>21</sup>.

A associação do biomarcador da proteína p16 em conjunto com outros biomarcadores ou métodos moleculares apresenta-se como uma possível solução para a diferenciação de pacientes que poderão ter uma CIN1 persistente com a possibilidade de evolução para CIN III e carcinoma invasivo e poderá permitir um prognóstico da doença. Autores afirmam que o biomarcador de p16 predirá confiantemente casos de displasias estabelecidas por HPV de alto risco e que poderão experimentar progressão de doença<sup>21</sup>. Há necessidade de novos estudos, uma vez que existem vários fatores que operam em níveis moleculares, técnicos e interpretativos. Um estudo relatou recentemente que testes de DNA de HPV têm um papel na administração de doença cervical, na era da pré e pós-vacinação; porém, exige-se

que se desenvolvam e validem ensaios que possam identificar as mulheres com risco para CIN progressiva<sup>22</sup>. Sugerem a monitoração da expressão da oncogene do HPV e evidência de sua desregulação por descoberta direta de cópias de mRNA viróticas ou expressão da proteína p16 celular. Atualmente, há dados promissores que indicam que o mRNA de HPV e a p16 poderiam fazer um papel importante em desvendar a trama do desenvolvimento de um futuro câncer cervical<sup>23,24</sup>. No entanto, para isso, estudos randomizados grandes são necessários a fim de se confirmar os dados preliminares<sup>23</sup>.

### Conclusões

O biomarcador da proteína p16 isolado não é fator para prognóstico de CIN persistente, e a expressão de tal marcador é diferenciada entre os graus de CIN, sendo mais intensa em CIN III.

### Referências bibliográficas

1. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de incidência de câncer em 2008. Sistema de informação sobre mortalidade. [Citado 2009 Jul 20]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>
2. Cotran, Kumar, Robbins. Patologia estrutural e funcional. 5<sup>o</sup> ed. São Paulo: 1994. p. 213-98.
3. Souza NST, Melo VH, Castro LPF. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: acuidade da histopatologia. Rev Bras Ginecol Obstet. 2001;23(6):355-61.
4. Rocco JW, Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. Exp Cell Res. 2001;264(1):42-55.
5. Brenna SMF. Expressão proteica de p53 e c-myc como marcadores no prognóstico do carcinoma de colo uterino. Resumo de Tese. Rev Bras Ginecol Obstet. 2000;22(8):529.
6. McCluggage WG. **Immunohistochemical and functional biomarkers of value in female genital tract lesions.** Int J Gynecol Pathol. 2006;25(2):101-20.
7. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int J Cancer. 2001;92(2):276-284.
8. Ishikawa M, Fujii T, Masumoto N, Saito M, Mukai M, Nindl I, et al. **Correlation of p16INK4A overexpression with human papillomavirus infection in cervical adenocarcinomas.** Int J Gynecol Pathol. 2003;22(4):378-85.
9. Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, et al. P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. Hum Pathol. 2003;34(8):778-83.
10. Kalof A, Cooper K. p16INK4a immunoreactivity: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Adv Anat Pathol. 2006;13(4):190-4.
11. Vang R, Gown MA, Farinola M, Barry TS, Wheller D, Yemelyanova A, et al. P16 expression in primary ovarian mucinous and endometrioid tumors and metastatic adenocarcinomas in the ovary: utility for identification of metastatic HPV-related endocervical adenocarcinomas. Am J

Surg Pathol. 2007;31(5):653-63.

12. Bulten J, Van Der Avoort IA, Melchers WJ, Massuger LF, Grefte JM, Hanselaar AG, et al. P14ARF and p16INK4A two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2006;101(3):487-94.

13. Carozzi F, Cecchini S, Confortini M, Becattini V, Cariaggi MP, Pontenani G, et al. Role of P16(INK4a) expression in identifying CIN2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer.* 2006;108(2):119-23.

14. Kong CS, Balzer LB, Troxell LM, Patterson BK, Longrace TA. P16 immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol* 2007;31(1):33-43.

15. Ivanova TA, Golovina AD, Zavalishina LE, Volgareva GM, Katargin NA, Andreeva YY, et al. Up-regulation of expression and lack of 5' CpG island hypermethylation of p16 INK4a in HPV-positive cervical carcinomas. *BMC Cancer.* 2007;7:47.

16. Focchi GR, Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Dobo C, Oshima CT, Stavale JN. **Immunohistochemical expression of p16 (INK4A) in normal uterine cervix, nonneoplastic epithelial lesions, and low-grade squamous intraepithelial lesions.** *J Low Genit Tract Dis.* 2007;11(2):98-104.

17. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D, et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer.* 2004;4:58.

18. Albrecht V, Chevallier A, Bongain A, Lefebvre CJ, Giordanengo V. Immunohistochemical and molecular study of severe cervical dysplasia associated with HPV-83. *Gynecol Oncol.* 2007;105(1):252-5.

19. Missaoui N, Hmissa S, Frappart L, Trabelsi A, Abdelkader AB, Traore C, et al. p16INK4A overexpression and HPV infection in uterine cervix adenocarcinoma. *Virchows Arch.* 2006;448(5):597-603.

20. Regauer S, Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology.* 2007;50(5):629-35.

21. Fujii T, Saito M, Iwata T, Hirao N, Nishio H, Ohno A, et al. Ancillary testing of liquid-based cytology specimens for identification of patients at high risk of cervical cancer. *Virchows Arch.* 2008;453(6):545-55.

22. Mulvany NJ, Allen DG, Wilson SM. Diagnostic utility of p16INK4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies. *Pathology.* 2008;40(4):335-44. [citado 2008 Out 25]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=%22Pathology%22%5BJour%5D+AND+40%5Bvolum%5D+AND+4%5Bissue%5D+AND+335%5Bpage%5D+AND+2008%5Bdate%5D&cmd=detailssearch>

23. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(10):2536-45. [citado 2008 Nov 11]. Disponível em: <http://cebp.aacrjournals.org/content/17/10/2536.long>

24. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine.* 2008;26 (Suppl 10):K29-41.

---

#### Correspondência:

Melissa Silva Garcia Junqueira

Rua Lucas Mangini, 234 ap. 31

15091-270 – São José do Rio Preto – SP

Tel.: (17)3229-1777

e-mail: melissa.junqueira@gmail.com

---