

# O papel da expressão imunoistoquímica do P16<sup>INK4a</sup> e do P53 na predição da recorrência da nic-ag após tratamento por conização

## *The role of P16<sup>INK4a</sup> and P53 immunostaining in predicting recurrence of HG-CIN after conization treatment*

FERNANDA VILLAR FONSECA<sup>1</sup>; FLÁVIO DANIEL S. TOMASICH, TCBC-PR<sup>2</sup>; JULIANA ELIZABETH JUNG<sup>3</sup>; CARLOS AFONSO MAESTRI<sup>1</sup>; NEWTON SÉRGIO DE CARVALHO<sup>4</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** avaliar a expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup> e p53, nas peças de conização de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC-AG), correlacionando com a capacidade de prever o risco de recorrência. **Métodos:** estudo retrospectivo de pacientes com NIC-AG em biópsia de colo uterino, tratadas por conização, entre janeiro de 1999 e janeiro de 2006 e seguimento mínimo de 18 meses. A expressão dos biomarcadores p16 e p53 foi avaliada através de técnica de microarranjos teciduais e correlacionada com a recorrência da doença. Para análise utilizou-se o teste das proporções (qui-quadrado), considerando valor  $p < 0,05$ , IC95% e cálculos de sensibilidade, especificidade e acurácia destes imunomarcadores na predição de recorrência. **Resultados:** oitenta e três pacientes, idade entre 16 e 86 anos ( $35 \pm 11,7$ ), divididas em dois grupos: 30 com recorrência da NIC-AG (grupo estudo) e 53 sem recorrência (grupo controle). A média de idade, paridade, hábito de fumar e técnica de conização foram semelhantes nos dois grupos. A expressão do p53 esteve presente em 43% do grupo estudo e 57% do grupo controle e para o p16 esteve presente em 43% do grupo estudo e 57% do grupo controle ( $p > 0,05$ ). O p53 apresentou valor preditivo positivo (VPP) de 42% e valor preditivo negativo (VPN) de 73%, sensibilidade de 70%, especificidade de 47% e acurácia de 59%. O p16, VPP de 42% e VPN de 72%, sensibilidade de 66%, especificidade de 49% e acurácia de 56%. **Conclusão:** a expressão imunoistoquímica do p53 e do p16 apresentaram baixa sensibilidade e baixa especificidade como marcadores capazes de prever a recorrência da NIC-AG tratada por conização.

**Descritores:** Neoplasia Intraepitelial Cervical. Conização. Recidiva. Marcadores Biológicos.

### INTRODUÇÃO

O câncer do colo uterino ainda se apresenta como um problema de saúde pública no Brasil e no mundo, tanto por sua alta incidência, como por sua elevada morbimortalidade<sup>1,2</sup>.

O que particulariza este câncer em relação às demais neoplasias é o fato de que se desenvolve a partir de lesões pré-invasivas bem definidas, de comportamento conhecido, e de evolução lenta, as chamadas "neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC)"<sup>3</sup>.

Além da recorrência da lesão nos primeiros anos de seguimento, as mulheres que foram tratadas de NIC 2 ou 3 permanecem em risco de desenvolver um carcinoma invasor por um longo período de tempo<sup>4</sup>.

Os índices de recorrência pós-tratamento conservador variam entre 13 e 26%, nos trabalhos mais recentes<sup>5-7</sup>. Ainda não é possível prever quais casos de NIC irão progredir ou regredir. Seguimento regular por citologia pode proporcionar boa eficácia através da detecção das

alterações celulares e conseguir, com isso, significante redução nos índices de morbimortalidade do câncer do colo uterino através do diagnóstico precoce, entretanto, o custo-efetividade deste seguimento ainda está em debate<sup>8</sup>.

A detecção de alterações celulares originadas pela expressão desregulada das oncoproteínas virais aparece como promissor na caracterização de marcadores de progressão tumoral. A identificação e o estabelecimento do padrão de alteração dessas proteínas poderão definir marcadores com alto poder preditivo positivo<sup>4</sup>.

A proteína supressora tumoral celular p16<sup>INK4a</sup> tem sido identificada como um marcador da infecção por HPV (human papiloma vírus). Em uma infecção HPV transformante, os oncogenes virais E6 e E7 interferem substancialmente com a apoptose e a regulação do ciclo celular. Células afetadas expressam fortemente a p16 para controlar a ativação do ciclo celular irregular, podendo ser detectado por imunohistoquímica<sup>9,10</sup>.

A proteína 53 (p53) é uma proteína supressora tumoral que, nos seres humanos, é codificada pelo gene

1. Serviço de Patologia Cervical do Hospital Erasto Gaertner (HEG), Curitiba, PR, Brasil; 2. Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil; 3. Serviço de Anatomia-patológica do Hospital Erasto Gaertner (HEG), Curitiba, PR, Brasil; 4. Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná.

TP53<sup>11</sup>. Como “guardião do genoma” pode parar o ciclo celular em resposta a um dano ao DNA da célula. O oncogene viral E6 do HPV modifica a proteína p53 e a inativa, interferindo no controle do ciclo celular<sup>11</sup>.

A importância da inativação da p53 na carcinogênese cervical tem sido bem documentada, entretanto, estudos têm falhado em demonstrar diferentes escores de imunorreatividade da p53 em neoplasia intraepitelial cervical e o câncer cervical. Também têm reportado resultados conflitantes da relação entre a expressão do p53 e a progressão da neoplasia intraepitelial do colo uterino<sup>12</sup>.

Poucos estudos têm correlacionado a capacidade de prever a recorrência da NIC-AG tratada, com a expressão das proteínas tumorais por imunohistoquímica<sup>13,14</sup>.

Tendo em vista a importância da avaliação do papel dos biomarcadores na predição da progressão das lesões de NIC-AG, o presente estudo visa avaliar a expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup> e p53, nas peças de conização de pacientes com diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical, utilizando a imunohistoquímica em microarranjos teciduais, e correlacionando esta expressão com a capacidade de prever recorrência da doença.

## MÉTODOS

Foram avaliadas 83 pacientes com diagnóstico histológico de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC 2 e 3), que foram tratadas por conização, no Hospital Erasto Gaertner, Curitiba/PR, no período de janeiro de 1999 a janeiro de 2006.

A amostra de pacientes foi dividida em dois grupos: - Grupo ESTUDO (pacientes com recorrência da NIC-AG, após o tratamento por conização, em seguimento mínimo de 18 meses); - Grupo CONTROLE (pacientes com ausência de recorrência da doença, após tratamento por conização, em seguimento mínimo de 18 meses).

O estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HEG sob o protocolo nº 1947.

### Seleção da amostra

Critérios de inclusão: mulheres acompanhadas no Serviço de Patologia Cervical do HEG, entre 16 e 86 anos de idade, que foram submetidas à citologia, colposcopia e biópsia do colo uterino comprovando NIC-AG, e tratadas por conização, identificando qualquer grau de NIC no produto histológico do cone, e com seguimento mínimo de 18 meses. O seguimento foi considerado adequado quando era realizado através de citologia, colposcopia, e, se necessário, biópsia, em intervalo semestral.

Critérios de exclusão: dados insuficientes de prontuário, tempo de seguimento clínico pós-conização inferior a 18 meses, pacientes submetidas à histerectomia por doença benigna, presença de carcinoma invasor em biópsia

ou no produto da conização, ausência de evidência de neoplasia intraepitelial cervical após avaliação microscópica do produto de conização e blocos de parafina em condições inadequadas para a realização da imunohistoquímica.

Foi determinado como recorrência da doença a presença de NIC 1, 2 ou 3 em citologia, colposcopia e/ou biópsia de colo uterino durante o seguimento clínico.

### Técnica de preparo e leitura das lâminas para realização da imunohistoquímica

A expressão das proteínas foi observada em lâminas de *tissue microarray* confeccionadas a partir do bloco de parafina do produto de conização.

Foram confeccionados novos cortes histológicos, a partir dos blocos de parafina originais do produto da conização de cada paciente, pela técnica de *tissue microarray*, para serem submetidas à aplicação dos imunomarcadores p53 e p16<sup>INK4a</sup>, de forma artesanal, no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

Cada lâmina de *tissue* foi confeccionada com 20 amostras, sendo uma de cada paciente, totalizando seis lâminas de *tissue* para cada imunomarcador, sem identificação do grupo pertencente, de modo que a leitura da reação imunohistoquímica fosse feita evitando viés de contaminação.

Os kits de imunohistoquímica utilizados foram: - Anticorpo p53 pré-diluído (monoclonal de rato, clone DO-7, diluído 1:100, Biocare Medical®, Concord, USA); - Anticorpo p16 pré-diluído (monoclonal de rato, clone 16p04-jc2, diluído 1:100, Bio Sb®, Santa Barbara, California, USA).

Após preparo, as lâminas foram submetidas aos seguintes processos: desparafinização; recuperação antigênica com citrato pH 6,0; bloqueio de peroxidase endógena; diluição de cada anticorpo a 1:100 e aplicação do anticorpo primário sobre cada lâmina, depois lavagem com PBS específico de cada imunomarcador; aplicação do anticorpo secundário e, finalmente, aplicação do DAB específico e contracoloração.

Foram determinados os seguintes elementos imunohistoquímicos: positividade da reação e sua intensidade (análise qualitativa), padrão de positividade da reação (análise quantitativa) e imunolocalização (avaliada somente para o anticorpo p16).

Os elementos imunohistoquímicos foram definidos em semelhança à pesquisa de Jung *et al.*, publicada em 2010, em seu estudo de marcadores de progressão tumoral<sup>15</sup>.

A análise qualitativa foi dividida em reação positiva e negativa. A reação foi considerada positiva quando impregnou de coloração amarronzada os núcleos e/ou o citoplasma de ao menos 25% da amostra viável e avaliável do tumor. A reação negativa foi considerada quando não houve nenhuma coloração característica da reação imunohistoquímica.

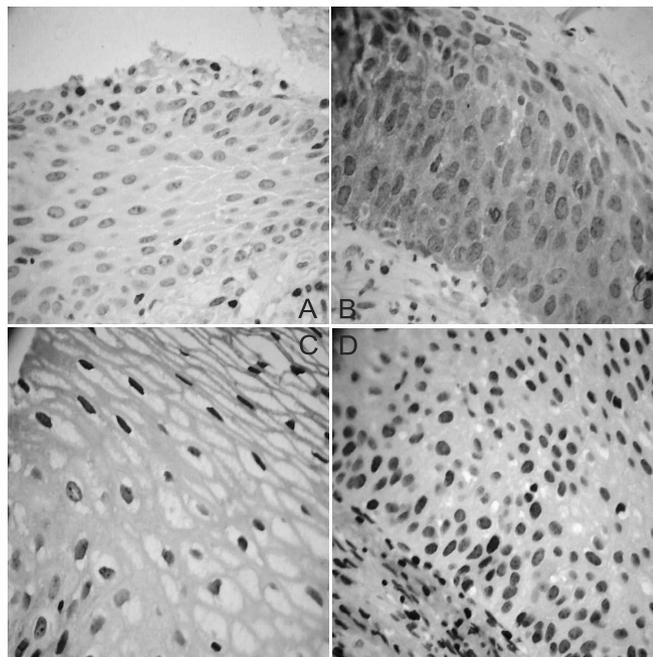
A reação positiva foi dividida em dois grupos: positiva forte (quando a intensidade da coloração foi semelhante ao controle utilizado) e positiva fraca (quando a intensidade da coloração foi substancialmente menor do que a do controle positivo utilizado, só podendo ser observada com clareza com aumento de 100 vezes).

A análise quantitativa foi classificada como: positividade difusa (a reação foi positiva numa extensão que englobava mais de 50% da amostra viável e avaliável), positividade multifocal intensa (a reação foi positiva numa extensão que englobava entre 25 e 50% da amostra viável e avaliável do tumor) e positividade multifocal leve (a reação foi positiva numa extensão que englobava menos de 25% da amostra viável e avaliável).

Para o p16 ainda foi determinado a imunolocalização e ficou assim classificado: padrão nuclear de positividade, padrão citoplasmático de positividade, padrão nuclear e citoplasmático de positividade simultâneos.

O imunomarcador demonstrou coloração castanho-amarronada, em nível nuclear, para os cortes positivos para o p53 e castanho-amarronada, em nível nuclear e citoplasmático, para o p16 (Figura 1).

Depois de aplicados esses critérios, o estudo resultou em 83 pacientes, sendo 30 no grupo estudo e 53 pacientes no grupo controle (organograma, Figura 2).



**Figura 1** - O contraste da expressão imunohistoquímica dos biomarcadores p16INK4 e p53 em peças histológicas contendo neoplasia intraepitelial cervical.

Fonte: Laboratório de Anatomia-patológica, HEG

A- reação negativa para p16 (nem núcleo nem citoplasma coram); B- reação positiva para p16 (coloração amarronada nos núcleos e citoplasma); C- reação negativa para p53 (nenhuma coloração nos núcleos); D- reação positiva para p53 (coloração amarronada no núcleos).

## Análise estatística

Foi realizada análise estatística das variáveis, utilizando-se o programa SPSS 12.0, buscando Intervalo de Confiança superior a 95% e nível de significância de 5%.

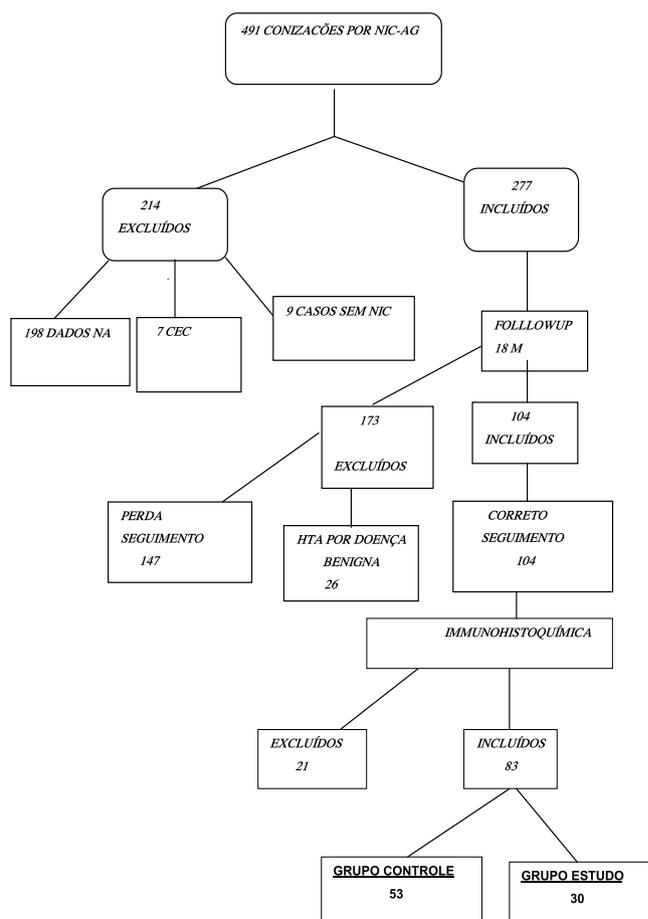
Para a equiparação dos dois grupos estudados foram avaliadas as variáveis idade, paridade, tipo de tratamento realizado e tempo de seguimento pós-tratamento.

Para a comparação da variável idade foi utilizado o teste t de *Student*. Para comparação da variável paridade foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Na análise dos imunomarcadores, a comparação da positividade de imunorreação entre os grupos estudo e controle foi realizada por meio do teste do qui-quadrado e/ou teste exato de Fisher e identificado o valor de p. Realizado ainda o cálculo do valor preditivo positivo (VPP) e do valor preditivo negativo (VPN), sensibilidade, especificidade e acurácia de cada marcador para prever a recorrência.

## RESULTADOS

O grupo estudo apresentou média de idade de 36±12 anos (IC95%: 33-40), média de paridade de 3±2 filhos (IC95%: 2-4), 42% tinham hábito de fumar e 95%



**Figura 2** - Diagrama Consort (Desenho do Estudo).

delas foram tratadas com conização por cauterio de alta frequência (CAF) e 5% com conização a bisturi a frio.

O grupo controle apresentou média de idade de 34±12 anos (IC95%: 31-37), média de paridade de 3±2 filhos (IC95%: 2-3), 50% tinham hábito de fumar e 92% delas foram tratadas por CAF e 8% com conização por bisturi a frio.

Não houve diferença estatística entre os grupos quando comparados por idade (p=0.2), paridade (p=0.2), hábito de fumar (p=0.5) e técnica de conização (p=0.7).

Das 83 pacientes analisadas, todas tinham resultado de NIC 2 ou 3 em biópsia de colo uterino prévia à conização e o produto histológico da conização exibiu resultados entre NIC 1 e 3. No produto de conização do grupo controle: três casos de NIC 1, 25 casos de NIC 2, 26 casos de NIC 3. No produto de conização do grupo estudo: três casos de NIC 1, nove casos de NIC 2, 18 casos de NIC 3, não demonstrando diferença estatística quanto ao grau da gravidade da NIC no produto final da conização, entre os grupos, no que tange ao risco de recorrência (p=0.1).

Na análise dos imunomarcadores, cada grupo foi avaliado individualmente para recorrência e/ou cura clínica e feito o cálculo do valor preditivo positivo (VPP) e do valor positivo negativo (VPN) do teste, a sensibilidade, a especificidade e a acurácia de cada marcador na previsão desta recorrência.

O p53 esteve presente em 43% (n=21) das pacientes do grupo estudo e em 57% (n=28) do grupo controle, e da mesma forma, não foi identificado em 73% (n=25) das pacientes do grupo controle e em 26% (n=9) do estudo. Não exibiu, portanto, valor de significância estatística para prever recorrência da doença, com valor de p igual a 0,1 (Tabela 1).

O p16 foi encontrado em 43% (n=20) das pacientes do grupo estudo e em 57% (n=27) do grupo controle. Em contraposto, não foi detectado em 72% (n=26) das pacientes do grupo controle e 28% (n=10) do grupo estudo. Da mesma forma, também não evidenciou valor de significância estatística para prever recorrência, com valor de p=0,1 (Tabela 1).

Baseado nesses dados, para o P53 o VPP foi 42% e o valor VPN, 73%. Este apresentou sensibilidade de 70%, especificidade de 47% e acurácia de 59% para prever a recorrência da NIC.

Para o p16, o VPP do exame foi 42% e o VPN, 72%, na mesma situação, demonstrando sensibilidade de 66%, especificidade de 49% e acurácia de 56% do teste para prever recorrência da doença.

Não houve diferença significativa na análise quantitativa da reação imunohistoquímica entre os grupos estudados para o p53 (Tabela 1).

Na análise quantitativa do p16, o único padrão identificado com clareza da reação imunohistoquímica, foi o que distinguiu entre forte, fraco e negativo para a proteína, pois dentre os que exibiram reação forte, 58% deles estavam no grupo estudo, os que exibiram reação fraca 74% estavam no grupo controle e dos que não exibiram reação, 72% estavam no grupo controle, identificando um valor de p=0,02 (Tabela 1).

Também para o p16, quando comparados os grupos na análise quantitativa, identificou-se que 70% dos que não exibiram reação estavam no grupo controle e que aqueles com reação de padrão forte/difuso/corando núcleo e citoplasma, 61% deles estavam no grupo estudo (Tabela 1).

**Tabela 1** - Análise quali-quantitativa da reação imunohistoquímica do p16 e do p53 como testes capazes de prever recorrência da NIC-AG tratada por conização.

	Imunorreação	P53		P16	
		Controle	Estudo	Controle	Estudo
Análise geral	Positivo	28 (57%)	21 (43%)	27 (57%)	20 (43%)
	Negativo	25 (73%)	9 (27%)	26 (72%)	10 (28%)
	Significância	P= 0,1		P= 0,1	
Análise quantitativa	Difuso (+)	10 (63%)	6 (37%)	19 (56%)	15 (44%)
	Multifocal intenso (+)	7 (54%)	6 (46%)	2 (67%)	1 (33%)
	Multifocal leve (+)	11 (55%)	9 (45%)	6 (60%)	4 (40%)
	Negativo	25 (73%)	9 (27%)	26 (68%)	12 (32%)
Análise qualitativa	Forte (+)	15 (62%)	9 (38%)	10 (42%)	14 (58%)
	Fraco (+)	13 (52%)	12 (48%)	17 (74%)	6 (26%)
	Negativo	25 (73%)	9 (27%)	26 (73%)	10 (27%)
Valor preditivo positivo		42%		42%	
Valor preditivo negativo		73%		72%	
Sensibilidade		70%		66%	
Especificidade		47%		49%	
Acurácia		59%		56%	

## DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas, diversos estudos epidemiológicos e laboratoriais têm demonstrado que o carcinoma invasor do colo uterino é uma doença complexa, com muitos determinantes ambientais e genéticos<sup>3</sup>. Apesar do adequado tratamento da lesão precursora, a recorrência da NIC ocorrerá em média em 1 a 25% dos casos, o que aumenta o risco para o câncer invasor<sup>16,17</sup>.

Determinar o risco de desenvolvimento e o prognóstico, bem como, o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constituem a principal razão para a identificação de biomarcadores<sup>8</sup>.

Muitos estudos recentes têm verificado a importância do p16 e do p53 na neoplasia cervical<sup>9,12-14,17-34</sup>. Em sua grande maioria avaliaram o percentual de positividade do imunomarcador em relação à presença de neoplasia intraepitelial cervical e correlacionaram com a gravidade da lesão<sup>9,12,13,17,18,21-29</sup>. Entretanto, poucos foram os estudos que relacionaram imunorreação com recorrência e/ou prognóstico da doença<sup>13,14-31</sup>.

Um estudo coreano<sup>13</sup> tentou correlacionar a via relacionada ao pRb com o risco de recorrência. Analisou 265 blocos histológicos de pacientes tratadas de NIC e submeteu a reação imunistoquímica para p16 e encontrou percentual menor da reação imunistoquímica nas pacientes de NIC 1, 2 e 3 que apresentaram recorrência do que no grupo que não encontrou recorrência, semelhante ao estudo aqui realizado.

Um estudo mais recente<sup>26</sup>, desenvolvido na Grécia, procurou identificar as principais alterações que ocorriam nos biomarcadores relacionados ao HPV após seis meses do tratamento da NIC e tentou identificar como sua expressão poderia prever a falha deste tratamento. E, embora a maioria dos marcadores avaliados, entre eles o p16, obtivesse altas taxas de negatificação de sua expressão, concluíram ser ainda necessária a análise de mais casos de falha terapêutica para poder identificar um marcador com acurácia elevada para poder garantir um seguimento de qualidade.

Outro estudo também recente<sup>14</sup>, analisando 55 casos de NIC 2 e 3 em peças de biópsias de colo uterino, estudou como os marcadores relacionados às vias do pRb e do P53 poderiam ser úteis na identificação da regressão da lesão. Concluiu que o alto percentual de expressão do pRb e do p53 estiveram relacionados à maior chance de regressão, o que, de certa forma, vem de encontro ao estudo aqui relacionado, que não conseguiu relacionar a superexpressão do p16 e do p53 com a recorrência da doença.

De forma diferente, alguns estudos mais antigos tentaram relacionar a expressão do p53 e do p16<sup>27,28</sup> com o prognóstico do carcinoma invasor. O primeiro<sup>27</sup> conseguiu relacionar a superexpressão do p53 com mau prognóstico do carcinoma invasor do colo uterino e correlacionou

esta expressão com menor sobrevida livre da doença e maior risco de recorrência. Entretanto o segundo<sup>28</sup>, avaliando a expressão do p53 e do p16 em pacientes com estágio clínico 1b e 2a de carcinoma de colo uterino, não conseguiu identificar esta correlação com fatores prognósticos.

Como ainda não há na literatura um padrão absoluto na leitura destes imunomarcadores, os critérios estabelecidos neste estudo foram determinados baseados na orientação do fabricante, nos padrões estipulados pela maioria dos trabalhos estudados e também na avaliação subjetiva dos autores, determinando os seguintes elementos imunistoquímicos: positividade da reação e sua intensidade (análise qualitativa), padrão de positividade da reação (análise quantitativa) e imunolocalização (avaliada somente para o anticorpo p16).

A maioria dos estudos relacionados acima<sup>9</sup> consegue identificar uma relação direta entre o percentual de positividade da expressão destes marcadores com a gravidade da doença, entretanto tem dificuldade de encontrar um padrão absoluto e 100% reprodutível que possa identificar a gravidade das lesões<sup>9</sup>. Talvez esta subjetividade possa ser encarada como um fator limitante da utilização desta tecnologia.

Autores americanos<sup>17</sup> encontraram percentual de positividade de 100% na expressão do p16 em lesões intraepiteliais de alto grau, porém correlacionou essa positividade com a presença de HPV de alto risco oncogênico, mostrando uma forte associação entre positividade difusa e forte e lesões por HPV de alto risco<sup>17</sup>.

Neste mesmo estudo<sup>17</sup>, encontraram na expressão do p16 positividade difusa em 70,2% dos casos de lesão de alto grau e 37,5% das lesões de baixo grau e que 84,8% da positividade difusa do p16 esteve relacionada à presença de HPV de alto risco oncogênico<sup>17</sup>.

No presente estudo, pôde-se ver a positividade maior do p16 nas pacientes cuja evolução da NIC 3 foi desfavorável, o que pode correlacionar-se com o tipo de HPV, uma vez que tipos diferentes de HPV podem apresentar graus diferentes de imunexpressão, mas isto foi uma limitação dessa pesquisa, pois não foi genotipado o HPV no presente estudo.

Comparando os dois grupos ora estudados, não se evidenciou diferença significativa na positividade do p16 entre o grupo controle e estudo, porém a positividade comparativa nos dois grupos, no mesmo grau de NIC foi maior no grupo estudo; e 61% dos casos com positividade forte e difusa estavam no grupo com evolução desfavorável, sugerindo uma tendência desta situação e que um estudo com maior número de casos talvez possa confirmar esse padrão de marcação do p16 como próprio de evolução desfavorável e/ou infecção transformante por HPV de alto risco.

Um estudo desenvolvido na Costa Rica, generalizando seus dados para uma coorte de 10.000 mulheres, encontrou um valor preditivo positivo de 13,9% do p16

nas NIC 3 e um valor preditivo negativo de 100%, concluindo que estudos futuros ainda são necessários para avaliar quando o manejo clínico deve ser modificado, baseado nos resultados da positividade do p16<sup>22</sup>.

Uma meta-análise, em 2006, pondera que nos últimos anos, o p16 tem sido extensivamente estudado como auxílio diagnóstico em vários cenários da doença ginecológica. Assim, como muitos marcadores, o p16 não é 100% sensível e específico para todas as lesões. Entretanto, há muitas áreas em que indubitavelmente se reconhece seu valor, frequentemente em combinação com outros marcadores, o que inclui a identificação de lesões de alto grau focal do colo uterino e a separação de lesões de alto grau de lesões benignas, mimetizando o alto grau<sup>10</sup>.

Outra meta-análise mais recente, concluiu que apesar das boas evidências da correlação da gravidade infecção pelo HPV com a positividade do p16, sua reprodutibilidade ainda é insuficiente para padronizá-lo na prática clínica<sup>9</sup>.

Avaliando-se os dados encontrados de positividade do p53 no presente estudo, quando se avalia sua expressão no grupo controle e no grupo estudo, não se encontrou nenhum padrão mais frequente de positividade na análise quantitativa do imunomarcador, reforçando a ideia de melhor valor preditivo negativo que positivo desse imunomarcador, demonstrando que quando o marcador é negativo a chance de ocorrer evolução desfavorável da NIC pós-conização é muito pequena, mas quando é positivo, não se pode prever a sua evolução, a não ser pelo seguimento clínico.

Estudando as lesões intraepiteliais de baixo grau e correlacionado com o tipo de HPV presente, alguns autores<sup>11</sup> concluíram que a expressão do p53 em lesões de baixo grau aumenta progressivamente em infecções por HPV de baixo risco oncogênico e se expressa menos, proporcionalmente, em infecções por HPV de intermediário e alto risco oncogênico, fato que pode estar relacionado às diferentes funções da proteína E6 conforme o tipo de HPV e a degradação da p53<sup>11</sup>.

Outros pesquisadores<sup>19,32</sup> não conseguiram identificar um padrão de expressão do p53 gradualmente maior quanto maior a gravidade da doença, concluindo, por seus dados, que alterações na p53 exercem um importante papel na patogênese do carcinoma escamoso cervical, porém a expressão do p53 não é suficiente para concluir sobre a carcinogênese cervical<sup>19</sup>.

De maneira semelhante ao nosso estudo, três outros estudos<sup>12,25,30</sup> avaliaram simultaneamente a positividade do p16 e do p53 nas lesões cervicais HPV-induzidas, entretanto, avaliaram o aumento da positividade dos marcadores com a gravidade da NIC, mas não com a possibilidade de recorrência.

Levando em consideração todos esses dados, ao que parece, a expressão tanto do p16 quanto do p53, em biópsias de conização, evidenciam fortemente a relação de gravidade da infecção do HPV com o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical, mas não podem ser considerados marcadores capazes de prever a recorrência da doença após tratamento por conização.

## A B S T R A C T

**Objective:** To evaluate the expression of p16<sup>INK4a</sup> and p53 biomarkers in conization specimens from patients with high grade cervical intraepithelial neoplasia (HG-CIN), correlating them with the ability to predict the recurrence. **Methods:** we conducted a retrospective study of patients with HG-CIN in cervical biopsy treated with conization between January 1999 and January 2006 who had a minimum follow-up of 18 months. The expression of the p16 and p53 was assessed by tissue microarrays and correlated with disease recurrence. For analysis, we used the test of proportions (chi-square), considering value  $p < 0.05$ , 95% CI and calculations of sensitivity, specificity and accuracy of these immunomarkers in predicting recurrence. **Results:** the series comprised 83 patients aged between 16 and 86 years ( $35 \pm 11.7$ ), divided into two groups: 30 with HG-CIN recurrence (study group) and 53 without recurrence (control group). Mean age, parity, smoking and conization technique were similar in both groups. The p53 expression was present in 43% of the study group and 57% of the control group, and the p16 was present in 43% of the study group and in 57% of the control group ( $p > 0.05$ ). p53 had a positive predictive value (PPV) of 42% and negative predictive value (NPV) of 73%, sensitivity 70%, specificity of 47% and accuracy of 59%. The p16, PPV 42%, NPV 72%, sensitivity 66%, specificity of 49% and accuracy of 56%. **Conclusion:** immunohistochemistry expression of p53 and p16 showed low sensitivity and low specificity as predictors of HG-CIN recurrence after conization treatment.

**Key words:** Cervical Intraepithelial Neoplasia. Conization. Recurrence. Biological Markers.

## REFERÊNCIAS

1. WHO. Cervical cancer. Internet. Acessado em: 15 set 2012. Disponível em: <http://www.who.int/en/>
2. INCA. Câncer de colo uterino/ taxas brutas de incidência, estimativa 2012. Internet. Acessado em: 15 set 2012. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2012>.
3. Sarian LO, Derchain SFM, Bastos JFB. Métodos diagnósticos para o rastreamento do câncer de colo [editorial]. Rev Bras Ginecol Obstet 2010;32(8):363-7.
4. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. Am J Obstet Gynecol. 2007;197(4):340-5.

5. Fonseca FV, Tomasich FDS, Jung JE. Lesões cervicais intraepiteliais de alto grau: avaliação dos fatores determinantes de evolução desfavorável após conização. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2011;33(11):334-40.
6. Lubrano A, Medina N, Benito V, Arencibia O, Falcón JM, Leon L, et al. Follow-up after LLETZ: a study of 682 cases of CIN 2-Cin 3 in a single institution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;161(1):71-4.
7. Nogara PR, Manfroni LA, da Silva MC, Consolaro ME. The "see and treat" strategy for identifying cytologic high-grade precancerous cervical lesions among low-income Brazilian women. *Int J Gynaecol Obstet.* 2012;118(2):103-6.
8. Termini L, Villa LL. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. *J bras doenças sex transm.* 2008;20(2):125-31.
9. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2009;35(3):210-20.
10. O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2006;13(1):8-15.
11. Giannoudis A, Herrington CS. Differential expression of p53 and p21 in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with low, intermediate, and high risk human papillomaviruses. *Cancer.* 2000;89(6):1300-7.
12. Bragança JF, Sarian LO, Pitta DR, Maito AB, Vassalo J, Pignataro F, et al. Expression of p16 and cervical infection with high-risk human papillomaviruses are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2008;18(5):1060-4.
13. Nam EJ, Kim JW, Kim SW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, et al. The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia: predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol.* 2007;104(1):207-11.
14. Ovestad IT, Gudlaugsson E, Skaland I, Malpica A, Munk AC, Janssen EA, et al. The impact of epithelial biomarkers, local immune response and human papillomavirus genotype in the regression of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. *J Clin Pathol.* 2011;64(4):303-7.
15. Jung JE, Anselmi Júnior R, Gennaro L, Leme FEG, Martins APC, Hirth CG, et al. Immunohistochemical assessment of E-cadherin, b-catenin, CEACAM-1 and PTEN: tumor progression markers in melanoma. *J Bras Patol Med Lab.* 2010;46(2):111-8.
16. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(7):884-91.
17. Nam K, Ryu A, Jeon S, Kim J, Kwak J, Park B. Clinical significance of a negative loop electrosurgical excision procedure biopsy in patients with biopsy-confirmed high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Low Genit Tract Dis.* 2015;19(2):103-9.
18. Ekalaksananan T, Pientong C, Sriamporn S, Kongyngyoes B, Pengsa P, Kleebkaow P, et al. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol.* 2006;103(1):62-6.
19. Mittal KR, Lin O, Chan W, Goswani S, Demopoulos RI. Cervical squamous dysplasias and carcinomas with immunodetectable p53 frequently contain HPV. *Gynecol Oncol.* 1995;58(3):289-94.
20. Cheah PL, Looi LM. P53 immunohistochemical expression: messages in cervical carcinogenesis. *Pathology.* 2002;34(4):326-31.
21. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol.* 2003;16(7):665-73.
22. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(8):1355-60.
23. Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, et al. P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006;202(2):77-83.
24. Salcedo MMBP, Silveira GPG, Zettler CG. A expressão da proteína p16 e herpes simples vírus tipo 2 em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo do útero. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008;30(2):61-6.
25. Tosun G, Sendag F, Zeybek B, Cosan Terek M, Guven C, Zekiogly O, et al. Immunohistochemical expressions of p16 and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia and in benign cervical tissue. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2010;31(6):627-31.
26. Valasoulis G, Koliopoulos G, Founta C, Kyrgiou M, Tsoumpou I, Valari O, et al. Alterations in human papillomavirus-related biomarkers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2011;121(1):43-8.
27. Brenna SMF. Expressão proteica de p53 e c-myc como marcadores no prognóstico do carcinoma de colo uterino. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2000;22(8):529.
28. Novik PR. Estudo do valor prognóstico da expressão imunohistoquímica de p53 e p16 no carcinoma do colo do útero estádios Ib e IIa. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2003;25(6):453.
29. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(11):1389-99.
30. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angström T, Lindström 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(7):2407-14.
31. Guerra F, Rocher AE, Villacorta Hidalgo J, Díaz L, Vighi S, Cardinal L, et al. Argentophilic nucleolus organizer region as a proliferation marker in cervical intraepithelial neoplasia grade 1 of the uterine cervix. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40(6):1717-24.
32. Shukla S, Dass J, Pujani M. p53 and bcl2 expression in malignant and premalignant lesions of uterine cervix and their correlation with human papilloma virus 16 and 18. *South Asian J Cancer.* 2014;3(1):48-53.
33. Andrade CE, Scapulatemo-Neto C, Longatto-Filho A, Vieira MA, Tsunoda AT, Da Silva ID, et al. Prognostic scores after surgical treatment for cervical intraepithelial neoplasia: a proposed model and possible implications for post-operative follow-up. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2014;93(9):941-8.
34. Cardoso FA, Campaner AB, Silva MA. Prognostic value of p16(INK4a) as a marker of clinical evolution in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3) treated by cervical conization. *APMIS.* 2014;122(3):192-9.

Recebido em 16/09/2015

Aceito para publicação em 08/12/2015

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

**Endereço para correspondência:**

Fernanda Villar Fonseca

E-mail: fvffonseca74@gmail.com