

# IMPORTÂNCIA DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16INK4A NO DIAGNÓSTICO E PROGRESSÃO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: REVISÃO SISTEMÁTICA

## THE IMPORTANCE OF P16INK4A PROTEIN EXPRESSION IN DIAGNOSIS AND PROGRESSION OF CERVICAL CANCER: A SYSTEMATIC REVIEW

Fabio Rodrigo Barbosa Dutra Nascimento<sup>1</sup>

Dafne Carolina Alves Quixabeira<sup>1</sup>

<sup>1,2</sup>João Luiz Quirino da Silva Filho, Jacinto Costa da Silva Neto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil;

<sup>2</sup>Faculdade de Interação do Sertão, Serra Talhada-PE, Brasil

### Resumo

O câncer de colo do útero é uma doença grave que acomete e leva ao óbito muitas mulheres em todo o mundo. No entanto essa patologia possui lesões pré-invasivas que evoluem lentamente e que podem ser detectadas precocemente. A expressão da proteína p16INK4A se encontra aumentada nessas lesões e portanto sendo útil como biomarcador. Foi realizada uma revisão sistemática da literatura mediante busca nas bases e dados SciELO e Medline utilizando os termos "p16INK4A+ câncer de colo do útero" e "p16INK4A+ lesão intraepitelial". O presente estudo visa realizar um levantamento de trabalhos publicados até abril de 2015 que relacionem a superexpressão da proteína p16INK4A com o diagnóstico e a progressão tumoral. Foram incluídos nessa revisão oito artigos que avaliaram a expressão de p16INK4A em amostras citológicas e/ou histológicas e estratificadas de acordo com o grau da lesão. A superexpressão foi encontrada de forma progressiva de acordo com a gravidade da lesão sendo de até 30,3% em células normais e chegando até os 100% dos casos de carcinoma. A avaliação da expressão de p16INK4A pode ser relacionada com o grau da lesão tanto de amostras citológicas como histológicas podendo ser uma ferramenta útil para um melhor diagnóstico e também para o prognóstico já que pode ser associada com o risco de progressão dessas lesões.

**Palavras-chave:** Expressão de P16INK4A. Câncer de colo do útero. Lesão intraepitelial.

### Abstract

Cervical cancer is a serious illness that affects and leads to death many women around the world. However, this pathology possesses pre-invasive lesions that evolve slowly but they can be detected earlier. The p16INK4A protein expression is increased in these lesions and thus being useful as a biomarker. A systematic review of the literature search and data bases through SciELO and Medline using the terms "p16INK4A +cervical cancer" and "p16INK4A+ intraepithelial lesion". This study aims to conduct a survey of published works until April 2015 that relates to overexpression of p16INK4A protein with diagnosis and tumor progression. In this review eight articles were included which evaluated the p16INK4A expression in cytological and histological and/or stratified samples according to the degree of the lesion. The overexpression was found progressively according to the severity of the lesion being up to 30.3% in normal cells and reaching as far as the 100% cases of carcinoma. The assessment of p16INK4A expression may be related with the degree of injury tact of histological and cytological samples as a useful tool for a better diagnosis and prognosis since it can be associated with the risk of progression of these lesions.

**Keywords:** P16INK4A expression. Cervical cancer. Intraepithelial lesion.

## Introdução

A neoplasia do colo do útero é a segunda mais incidente em mulheres, correspondendo a 528.000 casos e cerca de 266.000 mortes no mundo (WHO, 2012). Aproximadamente, cerca de 85% dos casos de câncer cervical encontra-se em regiões de países em desenvolvimento como América do Sul, África e o sul da Ásia (Ferlay et al., 2010). No Brasil, em 2015, estima-se 15.000 novos casos da doença (INCA, 2015).

O câncer de colo do útero se desenvolve a partir de lesões pré-cancerosas bem definidas, de evolução lenta, mas com potencial para progredir para a doença invasiva se não forem detectadas e tratadas precocemente (Sarian et al., 2010). Sabe-se que o principal fator de desenvolvimento desse tipo de câncer é a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) (Simonato, Miyahara, 2007).

O mecanismo pelo qual o HPV influi o ciclo celular, acarretando em sua desregulação e progressão da lesão, inclui fatores inerentes ao genótipo viral e à sua relação com a célula hospedeira. Essas interferências no metabolismo celular poderão causar modificações que levam ao aparecimento de moléculas denominadas biomarcadores (Da silva, Santos, Stingham 2010). Entre os biomarcadores relacionados com a expressão oncogênica desregulada do HPV, a proteína inibidora de quinase p16INK4A, possui sua expressão aumentada, sendo alvo de vários estudos que apontam essa super expressão como marcador de lesões cervicais induzidas pelo HPV e indicador de mau prognóstico (Anghebem-Oliveira, Merlin, 2010).

## Metodologia

Foram realizadas buscas de artigos publicados em periódicos indexados nas principais bases de dados disponíveis on line: Medline ([www.ncbi.nlm.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed)) e SciELO ([www.Scielo.org](http://www.Scielo.org)) de março a abril de 2015.

As palavras chaves utilizadas nas buscas foram no mínimo: p16INK4A + câncer de colo do útero, p16INK4A + lesão + intraepitelial. Para inclusão dos artigos na revisão, os mesmos

A p16INK4A (MTS1 ou p16), produto do gene CDKN2A, é constituída de 156 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de 16KD. É uma proteína de supressão tumoral que age freando o ciclo celular (Li, Poi, Tsai, 2011).

Atua como regulador negativo da trajetória do complexo formado pela proteína Retinoblastoma e fatores de transcrição E2F (pRb/E2F). Esses complexos previnem o acesso dos fatores de transcrição aos genes promotores associados ao mecanismo de proliferação. A pRb é progressivamente fosforilada pelas ciclinas dependentes de quinase 4 e 6 (CDK4 e CDK6) no final da fase G1, resultando na fase S. A ligação direta com a p16 regula as atividades de CDK4 e CDK6, mantendo a pRb hipofosforilada (Li, Poi, Tsai, 2011; Ferraz et al, 2012).

A p16 está também relacionada a senescência celular pois sua expressão aumenta notavelmente com o envelhecimento em vários tecidos. Isso demonstra a diminuição do potencial de replicação e auto renovação para certos compartimentos de reserva, uma característica do envelhecimento (Li, Poi, Tsai, 2011).

Diversos trabalhos têm demonstrado a importância do uso de biomarcadores no diagnóstico do câncer de colo uterino, seja como alternativa ou suplemento aos métodos atuais de rastreio como a colpocitologia (Sarian et al., 2010). O presente estudo visa realizar um levantamento de trabalhos publicados até abril de 2015 em que relacione a superexpressão da proteína p16INK4A com o diagnóstico e a progressão tumoral.

deveriam ser trabalhos originais e deveriam conter análise da expressão da p16INK4A em amostras de pacientes com diagnóstico de lesões pré-invasivas ou câncer de colo do útero. Foram selecionados artigos publicados nos últimos 5 anos. Os trabalhos excluídos eram os que continham expressão de p16INK4A em outros tipos de câncer e os artigos de revisão.

## Resultados e Discussões

Após a consulta aos portais de periódicos disponíveis, foram encontrados 17 trabalhos relacionados ao tema. Sendo que 9 foram excluídos da pesquisa por se tratarem de trabalhos de revisão, metanálise e outros tipos de câncer. Ao final, 08 artigos originais compuseram a análise final desta revisão sistemática (figura 1).

Os resultados foram dispostos em tabelas que incluem dados acerca do autor, ano de publicação e classificação Qualis. Juntamente com essas informações, estão dispostas as variáveis analisadas que incluem: o número de casos estudados, as categorias diagnósticas das amostras coletadas e seu número absoluto, a expressão de células p16 positivas em percentual (tabelas 1 e 2).

Em seis trabalhos, a expressão de p16 foi avaliada utilizando-se a técnica de imunohistoquímica. Em um trabalho a avaliação foi feita através da imunocitoquímica e em outro, ambas as técnicas foram utilizadas.

Dos 8 trabalhos estudados três analisaram somente a superexpressão da p16 enquanto os outros analisaram essa superexpressão associada com outro biomarcador, principalmente o Ki-67. Em ambas as formas demonstrou-se significância estatística ( $p < 0,005$ ) entre os diagnósticos histológicos e/ou citológicos e a porcentagem de células p16 positivas.

Os trabalhos avaliaram amostras de pacientes da América do Norte, Europa e Ásia. As idades dessas pacientes variaram de 18 a 85 com média de 41,25 anos. Todas as amostras histopatológicas foram revisadas por pelo menos dois patologistas experientes e classificadas de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Os estudos demonstraram quantidades similares de amostras positivas para a p16 em cada categoria diagnóstica. Os casos diagnosticados como normais

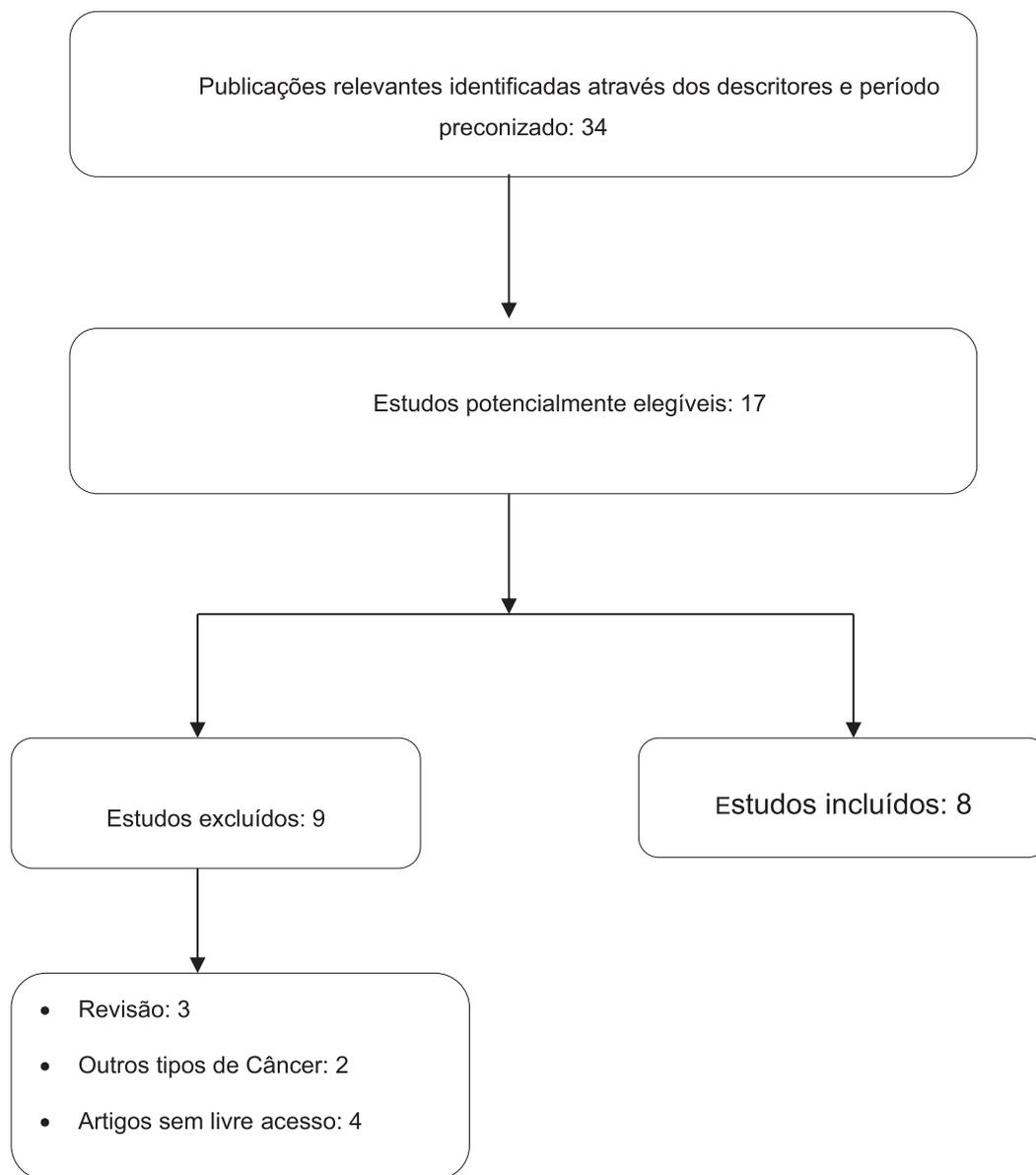
tiveram entre 0% e 30.3% de expressão de p16 enquanto os de NIC-I (neoplasia intraepitelial cervical de grau 1) variaram sua expressão de 32.3% a 54.6%. Os casos de NIC-II (neoplasia intraepitelial cervical de grau 2) e NIC-III (neoplasia intraepitelial cervical de grau 3) tiveram de 82% a 100% de células positivas. Casos diagnosticados de carcinoma apresentaram positividade entre 85% e 100%.

Nos estudos em que houve avaliação da expressão de p16 em amostras citológicas, os casos diagnosticados como NILM (negativo para lesão intraepitelial e malignidade) apresentaram até 19.6% de positividade. As amostras de ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado) tiveram 40% de expressão enquanto que as de LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau) variaram de 55,6% a 68,8%. Nos casos de HSIL (lesão intraepitelial de alto grau) houve expressão em 91% a 95,35% das células e de 82,5% nas amostras consideradas como ASC-H (células escamosas atípicas, não é possível excluir lesão de alto grau). As amostras de carcinoma apresentaram de 88,9% a 100% de expressão positiva para p16.

Entre os trabalhos analisados cinco também avaliaram a dupla marcação p16/Ki-67 o que levou a uma maior sensibilidade (91.3%) e especificidade (98,8) nas classificações das lesões.

Dos dois trabalhos que tiveram análise por meio da citologia, o primeiro concluiu que a expressão de p16 tem maior sensibilidade (90,9%) e especificidade (93,5%) na triagem das lesões pré-cancerosas do que o teste de captura híbrida para o HPV de alto risco. No outro, ficou claro que a relação p16/ki-67 pode reduzir a necessidade de colposcopia pela metade.

**Figura 1: Fluxograma de seleção de estudos para a revisão sistemática**



**Tabela 1 - Estudos que avaliaram a expressão de p16I por imunohistoquímica e sua relação com o diagnóstico.**

Autor	Número de Casos	Categoria da amostra e expressão positiva de P16 <sup>INK4a</sup>				
		Normal	NIC-I	NIC-II	NIC-III	Carcinoma
Izadi-Mood et al, 2012.B3.	78	5.1%(n=39)	54.6% (n=11)	72.7% (n=3)	82% (n=8)	85% (n=22)
Krishnappa et al, 2014.B1.	75	0%(N=25)	41.2% (n=9)	63.8% (n=8)	72%(n=9)	100% (n=25)
Aslani et al, 2013.B2.	77	27.7% (n=31)	50% (n=18)	100% (n=11)	100% (n=17)	N.A*
Kim et al, 2015.B2.	149	0% (n=17)	32.3% (n=31)	60% (n=25)	100% (n=41)	97.1% (n=35)
Galgano et al, 2010.A1.	1455	30.3% (n=748)	39.3% (n=394)	77.4% (n=177)	99.2% (n=122)	100% (n=5)
Liao et al, 2014.A1.	463	3.7% (n=182)	42.7% (n=73)	75.5% (n=40)	79.6% (n=39)	100% (n=3)
Wentzensen et al, 2012.A1.	623	26.8% (n=112)	46.5% (n=228)	82.8% (n=169)	98.8% (n=83)	100% (n=6)

N.A\* = Não houve avaliação nessa categoria diagnóstica

**Tabela 2: Estudos que avaliaram a expressão de p16 por imunocitoquímica e sua relação com o diagnóstico.**

Autor	Número de casos	Categoria da amostra e expressão positiva de P16 <sup>INK4A</sup>					
		NILM	ASC-US	LSIL	HSIL	ASCH	Carcinoma
Ordi et al, 2014.B1.	1123	8,0% (n=423)	N.A*	55,6% (n=304)	91,0% (n= 378)	N.A*	88,9% (n=18)
Wentzensen et al, 2012.A1.	612	19,6% (n=143)	40% (n=117)	68,8% (n=138)	95,35% (n= 148)	82,5% (n= 63)	100% (n=3)

N.A\* = Não houve avaliação nessa categoria diagnóstica.

O câncer de colo do útero é uma patologia que possui estreita relação com a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). A integração do vírus com a célula hospedeira produz alterações no ciclo celular que pode levar ao aparecimento de lesões que se não diagnosticadas e tratadas pode evoluir para o câncer. (Júnior, Giraldo, Gonçalves, 2006).

Apesar de extensos estudos sobre essas lesões precursoras, ainda existe uma considerável variação interobservador na interpretação de amostras de biopias do colo do útero (Regauer, Reich, 2007; Izadi-Mood et al., 2012). A fim de aprimorar essa limitação, a busca por biomarcadores específicos tem ganhado força na reprodutibilidade do diagnóstico de lesões intraepiteliais cervicais (Klaes et al., 2001; Volgareva et al., 2013).

A p16<sup>INK4a</sup> é uma proteína supressora tumoral que atua desacelerando o ciclo celular na transição da fase G1-S inibindo ciclinas dependentes de quinases (CDK4 e CDK6) que fosforilam e inativam a proteína do Retinoblastoma (pRb). Quando ocorre a inativação de pRb pela oncoproteína E7 do genoma viral há um aumento de p16 que impulsiona a célula hospedeira para a fase S do ciclo ( Li, Poi, Tsai, 2011; Krishnappa et al., 2014). Portanto a superexpressão de p16 representa um biomarcador valioso para as células com expressão ativa de oncogenes de HPV. (Fonseca et al., 2012; Almeida, Oliveira, 2014).

A análise dos estudos utilizados na

presente revisão sistemática aponta para a acurácia dos diagnósticos morfológicos por meio da superexpressão da p16.

Em praticamente todos os casos de câncer houve expressão de p16. Em dois estudos a positividade não ocorreu em todas as amostras porém foi maior do que a expressão em lesões precursoras. (Wentzensen et al., 2012; Galgano et al., 2010).

A variação da expressão em células consideradas normais foi de 0 a 30.3%. Essa expressão de p16 está ligada a senescência celular e também se encontra aumentada em células metaplásicas e tecidos em reparação e se mostrou menor do que em amostras de lesões precursoras do câncer (Li, Poi, Tsai, 2011; Wentzensen et al., 2012; Kim et al., 2015).

Entre as lesões intraepiteliais cervicais, a superexpressão de p16 mostrou um aumento progressivo e gradual de acordo com o grau da lesão tanto em diagnósticos histológicos como citológicos e com significância estatística (Ordi et al., 2013; Wentzensen et al., 2012; Carestiato et al., 2013). Os estudos mostram que além da avaliação de p16 melhorar o diagnóstico da lesão, também possui uma relação com o risco de progressão da doença, pois os casos de ASC-US, LSIL e NIC-I que foram positivos evoluíram para lesões de alto grau (Wentzensen et al., 2012; Liao et al., 2014; GALGANO et al., 2010).

A expressão de p16 juntamente com outro biomarcador do ciclo celular o Ki-67 mostrou grande utilidade na triagem do câncer de colo do útero diminuindo pela metade o número de mulheres submetidas a colposcopia. Isso aconteceu principalmente nos programas de rastreio que utilizam teste para a detecção do DNA de HPV de alto risco como a captura híbrida de segunda geração, pois embora esses testes sejam altamente sensíveis, não conseguem discriminar infecções transitórias comuns de lesões pré-malignas (Ordi et al.,2013; Ikenberg et al.,2013; Kim et al., 2015).

No artigo com maior número de casos

## Conclusão

Apesar das políticas públicas, programas de rastreio e avanços tecnológicos o câncer de colo uterino ainda é causa de óbito de muitas mulheres. Na busca por melhorar o diagnóstico das lesões pré-invasivas, a proteína p16INK4a tende a ser um biomarcador de grande utilidade na prática diária devido sua superexpressão estar claramente associada ao mecanismo de transformação celular, ser útil no diagnóstico permitindo diferenciar lesões

estudados e naquele que houve análise das pacientes desde a triagem, diagnóstico final e evolução houve uma unanimidade em enaltecer a capacidade da p16, tanto na imunohistoquímica como imunocitoquímica, em diferenciar amostras de células de lesão de baixo grau das de alto grau e o risco de progressão dessas lesões (Ikenberg et al., 2013; Galgano et al.,2010; Wentzsen et al.,2012).

Recentemente a p16 foi incluído pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical na detecção das lesões pré-cancerosas do trato genital inferior (Kim et al.,2015).

de alto grau e na identificação de lesões com risco evolutivo para invasão. Mais estudos associando a p16 com outros biomarcadores são necessários para esclarecer e aprimorar ainda mais as técnicas diagnósticas, principalmente no rastreio citológico das lesões precursoras desse tipo de câncer.

## Referências

- ALMEIDA AC, OLIVEIRA KB. Câncer de colo uterino: Desenvolvimento, diagnóstico, tratamento e marcadores moleculares. *Revista saúde e pesquisa* v.7,p.155-161. 2014.
- ANGHEBEM-OLIVEIRA, MI, MERLIN JC. A proteína p16 é o novo marcador para progressão no colo uterino? *Revista Brasileira de Análises Clínicas* v,42, p 181-185.
- ASLANI FS, SAFAEI A, POURJABALI M, MOMTAHAN M. Evaluation of Ki67,p16 and CK17 markers in differentiating cervical intraepithelial neoplasia and benign lesions. *Iran J Med Sci* v,38, 2013.
- CARESTIATO FN, AFONSO LA, MOYSÉS N, ALMEIDA FILHO GL, VELARDE LGC, CAVALCANTI SMB. An upward trend in DNA P16INK4A methylation pattern and high risk HPV infection according to severity of the cervical lesion. *Int. Med. Trop. São Paulo*, v 55, 2013.
- SILVA TG, SANTOS R, STINGHEN AEM. Biomarcadores em lesões do colo uterino. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v 42,p 161-164, 2010.
- FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of cancer*, v 127,p 2893-2917. 2010.
- FERRAZ LC, SANTOS ABR, DISCACCIATI MG. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelia cervical: Seleção de marcadores biológicos. *J Health Sci Inst*, v 30,p 107-111, 2012.
- FONSECA FV, TOMASICH FDS, JUNG JE. Neoplasia Intraepitelia cervical: Da etiopatogenia ao desempenho da tecnologia no rastreamento e no seguimento. *Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis*. v 24, p 53-61. 2012.
- GALGANO MT, CASTLE PE, ATKINS KA, BRIX WK, NASSAU SR, STOLER MH. Using biomarkers as objective Standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am j Surg Pathol*. v 34, p 1077-1087. 2010.
- IKENBERG H, BERGERON C, SCHMIDT D, GRIESSER H, ALAMEDA F, ANGELONI C, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual stained cytology: Results of the PALMS study. *Journal of the National Cancer Institute*. v 20. 2013.
- Brasil. INCA. Instituto Nacional do câncer. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. Acesso em 12 março 2015.
- IZADI-MOOD N, et al. Potencial diagnostic value of p16 expression in premalignant and malignant cervical lesions. *J Med Res Sci*. v 17,p 428-433. 2012.
- JÚNIOR JE, GIRALDO PC, GONÇALVES AK. Marcadores imunohistoquímicos de lesões precursoras do câncer de colo uterino associados ao HPV: O papel da proteína de supressão tumoral P16INK4A. *Jornal brasileiro de Doenças sexualmente Transmissíveis*. v 18, p 62-65. 2006.
- KIM TH, et al. Clinical implication of p16, ki-67 and proliferating cell nuclear antigen expression in cervical neoplasia: Improvement of diagnostic accuracy for high grade squamous intraepithelial lesion and prediction of resection margin involvement on conization specimen. *J cancer prev*. v 20, p 70-77. 2015.
- KLAES R, et al. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. v. 92, p 276-284. 2001.
- KRISHNAPPA P, MOHAMAD IB, LIN YJ, BARUA A. Expression of p16 in high risk human papillomavirus related lesions of the uterine cervix in a government hospital, Malaysia. *Diagnostic Pathology*. v. 19, p 202-207. 2014.
- LI J, POI MJ, TSAI MD. The regulatory mechanisms of tumor suppressor p16INK4A and relevance to cancer. *Biochemistry*. v. 50, p 5566-5582. 2011.
- LIAO GD, et al. P16INK4A immunohistochemical staining and predictive value for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1: A prospective study in China. *Int J Cancer*. v.134, p 1515-1724. 2014.
- ORDI J, SAGASTA A, RODRIGUÉZ-CARUNCHIO L, TORNÉ A, PINO M. Usefulness of p16/ki-67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Journal of National Cancer*. V 22, p 104-110. 2013.
- REGAUER S, AND REICH O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high grade cervical intraepithelial neoplasia (NICIII). *Histopathology*. v.50, p 629-635. 2007.
- SARIAN, LO; DERCHAIN, SFM; BASTOS, JF . Métodos Diagnósticos para o Rastreamento do Câncer do Colo. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. v.32, p.363-414,2010.

SIMONATO LE, MIYAHARA GI. O papel do papilomavirus Humano na Carcinogênese Bucal. Revista Brasileira de Cancerologia. v 53, p 471-476.2007.

VOLGAREVA G, , et al. Protein p16 as marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. BMC Cancer. v.58 p 1471-2407. 2004.

WENTZENSEN N, et al. Performance of p16/ki67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. Clin Cancer Res. v 18, p 4154-4162. 2012.

WHO. World Health Organization. Cervical Cancer. Internet. Disponível em: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/cancers/en> Acesso em 12 março 2015.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Recebido em: 25/04/2019

Aprovado em: 28/06/2019