

MARCADORES MOLECULARES COMO FERRAMENTA AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DE ANORMALIDADES CERVICAIS

Catharine de Araújo Crisóstomo

Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Patologia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife (PE), Brasil.

E-mail: catharine_araujo@hotmail.com

Mario Ribeiro de Melo-Júnior

Docente-orientador dos Programas de Pós-Graduação em Patologia (POSPAT) e Biologia Aplicada à Saúde (PPGBAS) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife (PE), Brasil.

Adrya Lúcia Peres Bezerra de Medeiros

Doutora pelo Programa Biologia Aplicada à Saúde (LIKA-UFPE); Docente da Faculdade Asces em Caruaru (PE), Brasil.

RESUMO: O câncer cervical é a quarta neoplasia mais diagnosticada em mulheres no mundo e a terceira no Brasil. A principal abordagem para conter seu avanço é o rastreamento pelo exame citológico. Para melhorar o desempenho desse teste, estudos vêm demonstrando o potencial de biomarcadores moleculares, principalmente aqueles envolvidos na regulação do ciclo celular. A detecção dessas moléculas por técnicas como a imunocitoquímica apresenta boa correlação com o grau de lesão intraepitelial e diminui a variabilidade interobservador. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar evidências científicas da eficiência dos marcadores p16INK4A, Ki-67, TopII α e MCM2 em pacientes com anormalidades cervicais e/ou positivas para o DNA do HPV. Para a realização desta revisão sistemática da literatura, no período de maio e junho de 2015, buscaram-se artigos nas principais bases de dados com os descritores “*biomarkers*”, “*molecular marker*” e “*cervical dysplasias*”. Incluíram-se artigos originais publicados na última década (2004-2015). Foram selecionados 15 artigos que contemplaram os critérios. Observou-se que o índice de positividade dos quatro marcadores se correlaciona com a gravidade da lesão. Eles demonstram potencial para a identificação de lesões intraepiteliais de alto grau implícitas. A coloração imunocitoquímica para detecção dessas moléculas ajuda na localização de células potencialmente anormais e contribui para a identificação de mulheres com maior probabilidade de desenvolver o câncer cervical, melhorando a sensibilidade do exame citológico.

PALAVRAS-CHAVE: Displasia do Colo do Útero; Marcadores Biológicos; *Papillomaviridae*.

MOLECULAR MARKERS AS AUXILIARY TOOLS IN CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF CERVICAL ABNORMALITIES

ABSTRACT: Cervical cancer ranks fourth as the most diagnosed neoplasm in females worldwide and third in Brazil. The cytological exam is the main approach for countering its progress. Improvement in the test's performance comprises molecular markers, especially those involved in the regulation of the cell cycle. Detection of molecules by immunocytochemistry has a good correlation with the degree of intra-epithelial lesion and decreases the interobserver's variability. Current research assesses scientific evidences of the efficiency of markers p16INK4A, Ki-67, TopII α and MCM2 in patients with cervical abnormalities and/or positive to the DNA of HPV. Articles were retrieved from databases by descriptors biomarkers, molecular marker and cervical dysplasias for the systematic review of the literature, between May and June 2015. Original articles published during the last ten years (2004-2015) were included, from which 15 articles were

selected. Positivity index of the four markers correlates with the seriousness of the lesion. They were capable of identifying high degree implicit intra-epithelial lesions. The immunocytochemistry stain to detect the molecules is a help in the localization of potentially abnormal cells and contributes towards the identification of females with a greater possibility in developing cervical cancer and, consequently, improvement in the sensitiveness of the cytological exam.

KEY WORDS: Cervical Cancer; Biological Markers; *Papillomaviridae*.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é a quarta neoplasia mais frequentemente diagnosticada em mulheres no mundo e responsável, segundo estimativas do GLOBOCAN 2012, por milhares de mortes, principalmente em países menos desenvolvidos (TORRE et al., 2015). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) calculou que, em 2014, ocorreriam 15.590 casos, o que torna esse tipo de neoplasia a terceira mais frequente neste gênero.

A principal abordagem para conter o avanço dessa doença é o rastreamento através do exame citológico, cujo principal objetivo é detectar lesões pré-neoplásicas antes que elas possam progredir para um estágio invasivo. Essa ferramenta foi desenvolvida pelo Dr. George Papanicolaou e consiste na análise de células obtidas a partir da cérvice uterina, através da microscopia (WENTZENSEN; KLUG, 2011). Uma vez detectada a anormalidade citológica, a avaliação é seguida pelo uso de outras técnicas, como a colposcopia e a biópsia cervical. Em casos de Lesão Intraepiteial de Alto Grau (compreende NICII e NICIII) e câncer, confirmado no histopatológico, o tratamento excisional é disponibilizado (WRIGHT; KUHN, 2012).

Países mais desenvolvidos conseguem implantar programas de rastreamento organizados, com alta cobertura da população-alvo, além de diagnóstico e tratamento adequados e em tempo hábil. Isso reduz drasticamente a incidência da doença, porém manter toda a infraestrutura e logística desses programas implica investimentos substanciais em saúde, o que constitui uma barreira para países com menos recursos. Diante dessas

dificuldades, tem-se fomentado a busca por métodos auxiliares que ajudem a otimizar o rastreamento citológico, tornando-o mais sensível e ainda mais eficiente.

Há um interesse atual na utilização de biomarcadores moleculares como método auxiliar aos procedimentos de triagem vigentes. Existem vários trabalhos avaliando o potencial clínico desses marcadores e os que se mostram mais propícios são moléculas envolvidas na regulação do ciclo celular ou marcadores de infecção por Papillomavirus Humano (HPV), o principal agente etiológico no desenvolvimento do câncer cervical (ASTBURY et al., 2006). O número de casos de câncer cervical é pequeno se comparado ao número de mulheres infectadas com o HPV. Portanto, o principal desafio é identificar aquelas pacientes que têm infecções importantes com maior risco de progressão para um estágio mais invasivo (ALSHENAWY, 2014).

Dentre as moléculas envolvidas na regulação do ciclo, encontramos a p16^{INK4A}, o Ki-67, a DNA Topoisomerase II α (Top II α) e o MCM2 (*Minichromosome Maintenance Protein 2*). Durante uma infecção clinicamente relevante por HPV de alto risco oncogênico (AR-HPV), as oncoproteínas virais E6 e E7 se ligam a proteínas regulatórias do hospedeiro, promovendo a degradação de supressores tumorais importantes, como a proteína p53 e a proteína do Retinoblastoma (pRb). Essas interações promovem alterações no ciclo celular manifestadas pela presença de uma fase S aberrante e proliferação celular descontrolada. Isso ocasiona a superexpressão de moléculas como a p16^{INK4A} (Inibidor de quinase dependente de ciclina, atua inibindo a progressão para a fase S do ciclo celular), o Ki-67 (proteína nuclear expressa durante as fases ativas do ciclo celular), a Top II α (enzima responsável pela separação das cromátides filhas durante a mitose) e a MCM2 (proteína que regula a montagem do complexo de pré-replicação durante a fase G1 do ciclo celular e também atua como uma helicase desenrolando o DNA) (SAHEBALI et al., 2006; PINTO; CRUM; HIRSCH, 2010; HALLOUSH, 2008).

Top II α e MCM2 podem ser avaliadas simultaneamente através de um coquetel, conhecido como ProEx C (BD *Diagnostics*), formado por dois anticorpos monoclonais que têm como alvo a expressão dessas duas proteínas. Outro coquetel, conhecido

como *CINtec Plus Cytology* (Roche mtm Laboratories), detecta simultaneamente a expressão de p16 e Ki-67. Esses dois produtos vêm apresentando resultados promissores em diversos estudos (OZAKI; ZEN; INOUE, 2010; PETRY et al., 2011). A detecção dessas moléculas por diversas técnicas, como a imuno-histoquímica ou imunocitoquímica, apresenta boa correlação com o grau de lesão intraepitelial e é de grande auxílio em casos de dúvidas diagnósticas, ajudando a diminuir a variabilidade entre observadores (PINTO; CRUM; HIRSCH, 2010).

Diante da elevada incidência do câncer cervical no Brasil e no mundo e dada a utilidade dos biomarcadores em melhorar a acurácia do rastreamento citológico e, assim, ajudar a conter o avanço desta doença, este estudo se propôs a avaliar as evidências científicas sobre a eficiência dos marcadores p16^{INK4A}, Ki-67, TopII α e MCM2 em pacientes com anormalidades cervicais e/ou positivas para o DNA do HPV.

2 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo de revisão sistemática, conduzido conforme a metodologia *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)*, que foi realizado entre maio e junho de 2015. Durante esse período, avaliaram-se diferentes tipos de estudos disponíveis nas bases de dados *Science Direct*, Biblioteca Virtual em Saúde - BVS, *US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed)* e *Google Acadêmico*, bem como dados que contivessem os descritores obtidos a partir do vocabulário DeCS - Descritores em Ciências da Saúde - utilizados nesta revisão, que foram “*biomarkers*” ou “*molecular marker*” e “*cervical dysplasias*”.

Como critérios de inclusão, foram selecionados artigos publicados entre 2004 e 2015 (disponíveis na íntegra em inglês ou português) que revelassem pesquisas em seres humanos avaliando o potencial dos marcadores p16^{INK4A}, Ki-67, TopII α e MCM2, detectados por imunocitoquímica, a partir de amostras provenientes da citologia convencional ou em base líquida, em pacientes com anormalidades cervicais ou sem anormalidades, mas com teste para DNA-HPV positivo.

Estas anormalidades incluem atipias (Atipia em Células Escamosas de Significado Indeterminado - ASC-US ou Atipia em Células Escamosas, não podendo excluir Lesão de Alto Grau - ASC-H), Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau - LSIL (compreende o efeito citopático do HPV e/ou NIC I), Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau - HSIL (compreende NIC II e NIC III) e Carcinoma Epidermoide.

Foram excluídos do estudo artigos de revisão, pesquisas envolvendo a análise de marcadores diferentes dos quatro que já foram pré-estabelecidos e aqueles que apresentassem temas não pertinentes aos objetivos propostos.

Após consulta às bases de dados e a aplicação das estratégias de busca, foram identificados os artigos que estavam em duplicidade nas bases. Os títulos e resumos dos artigos foram lidos para determinar a elegibilidade conforme os critérios de inclusão pré-estabelecidos. Nos casos em que a leitura do resumo não era suficiente para determinar sua inclusão no estudo, o artigo era lido na íntegra.

A análise dos trabalhos encontrados foi feita de forma descritiva e dividida em duas etapas: na primeira, procurou-se registrar as principais características dos estudos, como autoria, ano, local de estudo, tamanho da amostra, delineamento do estudo; na segunda etapa buscou-se compilar dados em relação à eficiência dos marcadores como o índice de positividade, além de valores de sensibilidade e especificidade quando estes dados estavam disponíveis.

3 RESULTADOS

Após a eliminação de 61 artigos duplicados, foram localizados 1.046 artigos. A base de dados *ScienceDirect* apresentou um maior número de trabalhos, totalizando 702 pesquisas. Desse total, 697 foram excluídos após a leitura dos resumos, por não se enquadrarem nos critérios de inclusão previamente estabelecidos. Na sequência, a base de dados *PubMed* localizou 303 artigos, sendo que 293 foram retirados após a leitura dos resumos. O *Google Acadêmico* exibiu 45 artigos; destes, após filtragem pela leitura dos títulos e dos resumos, nenhum trabalho

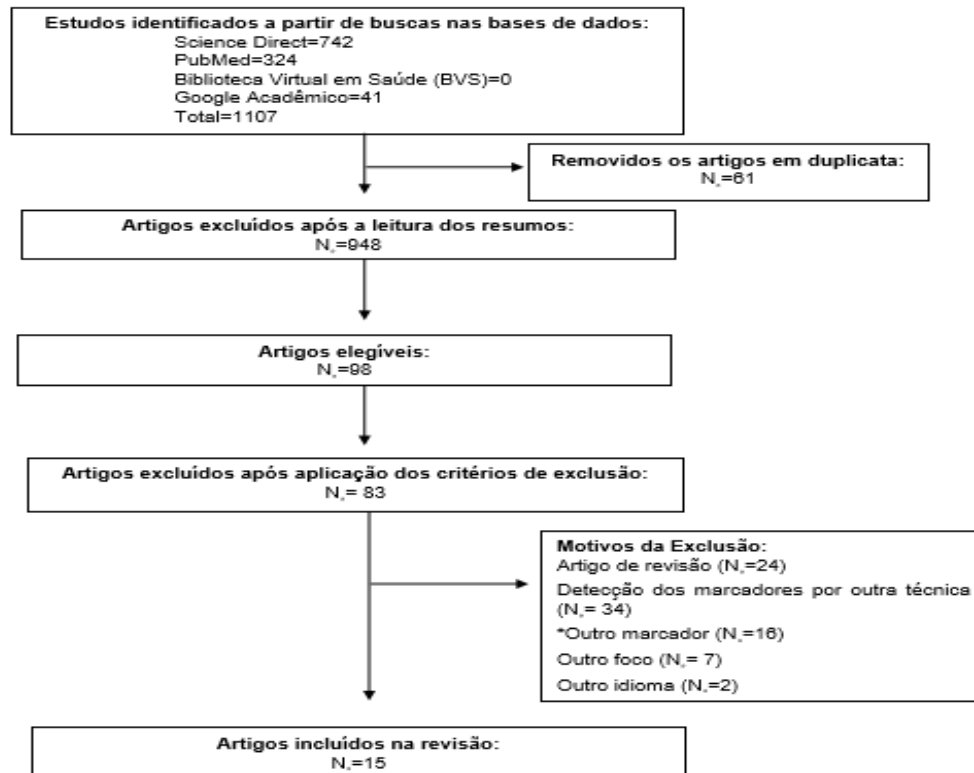


Figura 1. Fluxograma de identificação e seleção dos artigos para revisão sistemática sobre os marcadores moleculares no diagnóstico de lesões cervicais

Nota: *Outro marcador: se refere a marcadores diferente de p16^{INK4a}, Ki-67, TOPII α e MCM2

permaneceu. A Figura 1 apresenta a síntese do processo de seleção dos artigos.

Durante a busca, uma ampla variedade de estudos apresentou a detecção dos marcadores em tecidos pela técnica de imuno-histoquímica; estes foram excluídos, uma vez que o foco do presente trabalho é a detecção dos biomarcadores em células pela técnica de imunocitoquímica.

O Quadro 1 apresenta as principais características dos trabalhos selecionados segundo referência, ano de publicação, local de realização do estudo, fonte de dados e objetivos.

Todos os trabalhos selecionados foram pesquisas realizadas fora do Brasil. As publicações predominam em periódicos sobre ginecologia, oncologia e citopatologia.

A maioria dos artigos (8/15) analisa o potencial do p16 em melhorar o rastreamento citológico em anormalidades cervicais de diferentes graus e/ou na presença de infecção por HPV. Um número menor de trabalhos (5/15) avaliou o desempenho do CINTEC plus, um produto que detecta simultaneamente a expressão anormal de p16 e Ki-67.

Dois trabalhos realizaram ensaios com ProExC, coquetel que detecta a expressão anormal de TOPII α e MCM2 para verificar a eficiência dessa ferramenta em identificar lesões cervicais clinicamente relevantes. As principais características dos trabalhos estão expostas no Quadro 1.

Para demonstrar a eficiência dos biomarcadores, foram extraídos dados da maioria dos artigos selecionados que demonstram o índice de positividade em relação à anormalidade citológica ou infecção por HPV. Alguns estudos também utilizaram resultados histológicos e colposcópicos e, assim, conseguiram avaliar o percentual de sensibilidade e especificidade dos biomarcadores em detectar lesões de alto grau. Os achados estão expostos no Quadro 2.

Quadro 1. Características dos estudos que avaliam o desempenho dos marcadores p16^{INK4a}, Ki-67, TOPII α e MCM2

Referência, ano	Local	Fonte de Dados	Objetivos
WENTZENSEN et al., 2006	França	Amostras citológicas diagnosticadas como ACS-US e LSIL, selecionadas do arquivo do Laboratório Pasteur-Cerba	Propor um escore qualitativo para avaliar células positivas para p16, baseado em alterações nucleares, em amostras de citologia em base líquida
EKALAKSANANAN et al., 2006	Tailândia	Mulheres que tinham exame citológico anormal durante o período de recrutamento em um estudo de coorte prospectivo 2-5 anos antes	Investigar a utilidade da combinação simultânea do teste para a proteína p16 e o teste DNA-HPV no rastreamento para o câncer cervical
MEYER et al., 2007	EUA	Amostras cervicais obtidas a partir da citologia em base líquida do Brigham and Women's Hospital e Medical University of South Carolina	Investigar p16 como um potencial biomarcador para complementar o diagnóstico citológico
CAROZZI et al., 2008	Itália	Mulheres foram recrutadas entre 2003 e 2004 em nove programas de rastreamento organizados na Itália	Estimar a sensibilidade e a especificidade da superexpressão de p16 em mulheres DNA-HPV-positivas, histologicamente confirmadas NIC 2 ou 3 ou Câncer cervical
BECCATI et al., 2008	Itália	Amostras de citologia em base líquida, obtidas a partir dos arquivos do Ferrara Screening Program	Avaliar os marcadores ProExC e Ki-67 em lesões intraepiteliais escamosas para identificar um perfil biomolecular informativo para o diagnóstico de lesão intraepitelial de alto grau.
KURSHUMLIU; THORNS; GASHI-LUCI, 2009	Kosovo	Amostras citológicas obtidas de dois laboratórios independentes. As pacientes envolvidas tinham sido diagnosticadas com LSIL no exame citológico.	Validar o papel da imunocitoquímica para p16 como um marcador de neoplasia epitelial cervical em amostras cervicais e de biópsia.
DENTON et al., 2010	Itália e Suíça	Casos de citologia cervical foram identificados nos arquivos de cinco laboratórios de anatomia patológica	Validar a performance da p16 em um amplo número de amostras citológicas.
SHIDHAM et al., 2011	EUA	Cell blocks foram feitas a partir de amostras citológicas obtidas por citologia em base líquida	Avaliar a imunorreatividade de p16 em seções de cell block.
DEPUYDT et al., 2011	Bélgica	Amostras cervicais foram coletadas em oito programas de rastreamento em Flanders	Investigar o potencial do ProExC como uma ferramenta de triagem seguinte ao screening primário por citologia ou por detecção do DNA-HPV de alto risco, para auxiliar na identificação de lesão cervical de alto grau.
PETRY et al., 2011	Alemanha	Mulheres com idade igual ou superior a 30 anos, que apresentaram exame citológico negativo e Teste para DNA-HPV positivo	Avaliar a performance da dupla coloração para detecção de p16/Ki-67 em um grande número de mulheres com 30 anos ou mais.
CAROZZI et al., 2012	Itália	Mulheres foram recrutadas entre 2003 e 2004 em nove programas de rastreamento organizados na Itália	Investigar a relação entre o status de p16 na linha de base e o risco de NIC 2 ou pior durante três anos de seguimento.
WENTZENSEN et al., 2012	EUA	Mulheres referidas à colposcopia após apresentarem exames citológicos anormais	Avaliar a performance clínica de p16/Ki-67 em um amplo estudo de mulheres referidas a colposcopia.
DONÀ et al., 2012	Itália	Pacientes referidas à colposcopia após apresentar resultados citológicos anormais e mulheres que apresentaram teste DNA-HPV positivo	Avaliar a associação da expressão de p16/Ki-67 com o status de infecção por HPV e genotipagem, além do grau de anormalidade citológica e histológica.
IKENBERG et al., 2013	Bélgica, França, Alemanha, Itália e Espanha	Amostras coletadas em 196 centros de rastreamento; mulheres com idade igual ou superior a 18 anos foram envolvidas no estudo	Estimar a sensibilidade e especificidade de p16/Ki-67 e comparar com a citologia e o Teste de HPV-DNA em mulheres com 30 anos ou mais.
UIJTERWAAL et al., 2014	Holanda	Amostras citológicas de mulheres com diagnóstico limítrofe/discariose leve na citologia	Avaliar a performance longitudinal de p16/Ki67 para detecção de NIC II e NIC III ou pior em mulheres com discariose leve e comparar os resultados com o teste DNA-HPV basal.

Quadro 2. Potencial dos marcadores moleculares em identificar lesão intraepitelial escamosa de alto grau

Autor, Ano	Amostra (N)	Marcador analisado	Categoria Citológica/ Percentual de positividade do biomarcador	Sensibilidade para detectar Lesão de Alto Grau	Especificidade para detectar Lesão de Alto Grau
WENTZENSEN et al., 2006	225	p16	ASC-US e LSIL/ 52% (116 de 225)	96%	83%
EKALAKSANANAN et al., 2006	186	p16	NLIM/ 7,4% (11 de 148) ASC-US/ 62% (8 de 13) LSIL/ 64% (7 de 11) HSIL e CC/ 100% (14 de 14)	X	X
MEYER et al., 2007	394	p16	NLIM/ 9% (21 de 235) ASC-US /18% (9 de 49) LSIL /24% (14 de 57) HSIL/ 81% (43 de 53)	81%	62%
CAROZZI et al., 2008	1137	p16	LSIL/ 53% (92 de 175) HSIL e CC/ 91% (38 de 42)	88%	61%
BECCATI et al., 2008	76	ProExC e Ki-67	ProExC: LSIL/44% HSIL(NIC2) /50% HSIL (NIC3)/80% Ki-67: LSIL/48% HSIL(NIC2) /54% HSIL (NIC3)/87%	X	X
KURSHUMLIU; THORNS; GASHI-LUCI 2009	312	p16	LSIL/ 36,2%	X	X
DENTON et al., 2010	810	p16	HSIL (NICII+) 65,3% (145de222)	95,1% (Citologia com ASC-US) 96,4% (Citologia com LSIL)	63,2% (Citologia com ASC-US) 37,3% (Citologia com LSIL)
SHIDHAM et al., 2011	133	p16	ASCUS/ 0% (14 de 14) LSIL/ 26% (13 de 50) ASC-H/ 67% (14 de 21) HSIL/75% (21 de 28)	100%	75%
DEPUYDT et al., 2011	2905	ProExC (TopII α /MCM2)	LSIL (NIC I) 22% (9 – 41) HSIL(NIC II) 62%(13 – 21) HSIL(NIC III) 90% (19-21) CA 100% (4 – 4)	76,1% (Em pacientes infectadas c/ AR-HPV)	98,3% (Em pacientes infectadas c/ AR-HPV)
PETRY, et al., 2011	425	CINtec PLUS (p16/ Ki-67)	25,4% (108 de 425)	91,9% *Mulheres Pap Test negativo e Teste de AR-HPV positivo	82,1% *Mulheres Pap Test negativo e Teste de AR-HPV positivo
WENTZENSEN, et al., 2012	625	CINtec PLUS (p16/ Ki-67)	NLIM/ 19,6% ASC-US/ 40,2% LSIL/ 68,8% ASC-H/ 82,5% HSIL/ 95,3%	85,5%*Em mulheres com LSIL ou ASC-US + HPV positivo	59,4% *Em mulheres com LSIL ou ASC-US + HPV positivo
DONÀ, et al., 2012	140	CINtec PLUS (p16/ Ki-67)	NLIM/ 24%(9 de 38) ASC-US/ 43,7% (7 de 16) LSIL/ 48,3% (15 de 32) HSIL+/ 92,3%(50 de 54)	X	X
IKENBERG, et al., 2013	27.248	CINtec PLUS (p16/ Ki-67)	5,4% (1.462 de 27.248)	86,7%	95,2%
UIJTERWAAL, et al., 2014	256	CINtec PLUS (p16/ Ki-67)	NLIM 44,1% (15 de 34) LSIL/ 58,8% (20 de 34) HSIL(NICII)/ 80,6% (25 de 31) HSIL(NICIII)/ 100% (27 de 27)	89,7% *Em mulheres com LSIL ou Asc-us	73,1%*Em mulheres com LSIL ou Asc-us

Notas. NLIM: Negativo para Lesão Intraepitelial e Malignidade. ASC-US: Atipia em Células Escamosas de Significado Indeterminado. LSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau. ASC-H: Atipia em Células Escamosas não se pode excluir Lesão de Alto Grau. CC: Carcinoma Cervical. AR-HPV: Papillomavírus Humano de Alto Risco Oncogênico (16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68).

Em relação à sensibilidade e à especificidade em detectar lesão intraepitelial escamosa de alto grau, para o marcador p16^{INK4a}, a sensibilidade variou de 81% a 100%, enquanto que a especificidade variou de 37,3% a 83% nos diversos estudos. Analisando o ProEx C (kit para detecção simultânea de TOPII α e MCM2), somente em um estudo estes valores estavam disponíveis; nele, a sensibilidade foi de 76,1% e a especificidade de 98,3%. Por último, no *CINtec Plus Cytology* (kit que detecta simultaneamente a expressão p16 e Ki-67), a sensibilidade variou de 85,5% a 91,0%, e a especificidade de 59,4% e 98,3%.

4 DISCUSSÃO

O avanço das tecnologias tem contribuído para agregar melhorias aos programas de rastreamento e assim torná-los mais eficazes na detecção de mulheres que têm um maior potencial de progressão para o câncer cervical.

Os diversos estudos analisados mostram que os marcadores moleculares avaliados agregam vantagens, principalmente em relação à sensibilidade do exame citológico. Este último é reconhecido pela sua alta especificidade, porém apresenta uma sensibilidade limitada. Alguns países já incluíram em seus programas o teste para detecção do DNA-HPV de alto risco oncogênico (AR-DNA-HPV) como uma forma de maximizar a eficiência do rastreio. Apesar de o teste para HPV apresentar uma sensibilidade superior à citologia na detecção de lesões precursoras e câncer, ele é menos específico, principalmente em mulheres mais jovens, uma vez que não consegue diferenciar infecções transitórias daquelas persistentes, que promovem transformações importantes no ciclo celular do organismo afetado (WENTZENSEN et al., 2012). Os marcadores, por sua vez, mostram que é possível manter a alta especificidade da citologia e ainda melhorar a sensibilidade do rastreio.

O marcador p16 é extensivamente estudado na literatura. Ele é uma proteína que bloqueia a atividade das Quinases Dependentes de Ciclina (CDK 4/6), atua em um *feedback* negativo com outro supressor tumoral, a proteína do Retinoblastoma (pRB) e, dessa forma, regula negativamente a progressão do ciclo celular (PINTO; CRUM; HIRSCH, 2010). Diante de uma infecção por

HPV de alto risco oncogênico, a oncoproteína viral E7 se liga à pRB e promove sua degradação. Isso resulta em um aumento e ativação do fator de transcrição E2F que direciona para a fase S do ciclo celular. A oncoproteína E6 do vírus também alveja outro supressor tumoral, a proteína p53, a sua degradação inibe a apoptose e contribui para o desenvolvimento de uma fase S aberrante (MOODY; LAIMINS, 2010). Neste cenário, a ação regulatória da p16 é perdida e ela começa a ser superexpressa. A proteína, então, se acumula no núcleo e no citoplasma e pode ser detectada por técnicas como a imunocitoquímica. Em casos positivos, a célula exibe uma coloração marrom (PINTO; CRUM; HIRSCH, 2010).

Wentzensen et al. (2007) e Denton et al. (2010) utilizaram a coloração imunocitoquímica para p16 no intuito de identificar pacientes com lesão de alto grau (HSIL) que receberam diagnósticos equivocados de ASC-US e LSIL na citologia. Diante desses quadros de displasia leve, as principais condutas adotadas nos diversos programas são: repetição da citologia em um período de três a seis meses e teste para detectar o DNA-HPV ou biópsia guiada por colposcopia. Como os testes para DNA-HPV apresentam baixa especificidade, em muitos países, mulheres com LSIL na citologia são encaminhadas à colposcopia para detectar alguma HSIL implícita. Em ambos os estudos, observou-se uma boa correlação entre HSIL e a positividade do marcador, concluindo que p16 pode ser utilizado como uma ferramenta confiável que, além de diminuir a variabilidade interobservador, pode ajudar a reduzir o número de pacientes com ASC-US e LSIL direcionadas à colposcopia e, assim, otimizar os recursos dos programas.

A interpretação da positividade para p16 deve ser cuidadosa e baseada também em alterações nucleares, uma vez que estudos prévios já relataram a positividade inespecífica em algumas células metaplásicas, células endocervicais normais, epitélio atrófico e células de metaplasia tubária (KURSHUMLIU; THORNS; GASHI-LUCI, 2009).

As publicações mais recentes vêm demonstrando o potencial da combinação de marcadores. Se a coloração imunocitoquímica para p16 sozinho já oferece um ganho em sensibilidade e especificidade, isso é ainda mais notável quando, na mesma amostra, consegue-se avaliar mais

de um marcador. É o caso do kit *CINtec PLUS Cytology* (Roche *mtm Laboratories*), que detecta simultaneamente a expressão das proteínas p16 e Ki-67. “Em condições normais, a coexpressão dessas duas proteínas não ocorre, visto que elas têm efeitos opostos. A primeira tem atividade antiproliferativa, enquanto a última é dectável apenas quando as células estão proliferando. Portanto, a expressão concomitante dessas duas proteínas pode servir como um indicador de que o ciclo celular está desregulado por conta das oncoproteínas do HPV” (DONÀ et al., 2012, p. 199). Nesse teste, o caso é considerado positivo se uma ou mais células cervicais apresentar (em) uma coloração marrom no citoplasma (p16) e o núcleo vermelho (Ki-67), independente da interpretação de anormalidades morfológicas (WENTZENSEN et al., 2012).

O estudo de Donà et al. (2012) concluiu que existe uma forte correlação entre a positividade de p16/Ki-67 com o grau das lesões intraepiteliais e com a infecção por HPV, principalmente pelos dois tipos mais carcinogênicos, o 16 e o 18. Petry et al. (2011) sinalizam que a imunocoloração para p16/Ki-67 pode ser indicada para mulheres que apresentam citologia negativa e teste para AR-DNA-HPV positivo. Seus resultados demonstram que a alta sensibilidade e especificidade desse teste poderiam ajudar a revelar mulheres com alto risco de possuir uma lesão intraepitelial de alto grau implícita e, assim, direcioná-las para colposcopia imediata.

Em relação aos marcadores MCM2 e TOPII α , diante da metodologia empregada nesse trabalho, apenas dois estudos foram selecionados. Em ambos, utilizou-se o kit ProEx C (BD *Diagnostics*) que detecta simultaneamente a expressão dessas duas proteínas. O caso é considerado positivo quando o núcleo de células atípicas se cora em marrom. Depuydt et al. (2011), que analisaram aproximadamente três mil mulheres comparando diferentes métodos como citologia, teste para DNA-HPV e imunocitoquímica para TOPII α e MCM2, encontraram uma melhor efetividade se esses marcadores fossem utilizados após uma triagem inicial feita pelo teste para DNA-HPV. Essa estratégia permitiria uma maior sensibilidade e maior valor preditivo positivo para detectar lesão intraepitelial de alto grau implícitas. É válido ressaltar que, nesse mesmo estudo, em algumas lâminas, células não displásicas, provenientes do

epitélio endocervical e metaplasia tubária, apresentaram coloração inespecífica; estas, segundo os autores, puderam ser claramente identificadas pela morfologia e não foram consideradas positivas. O estudo de Beccatti et al. (2008), que avaliou o Kit ProExC e MIB-I - este último detecta apenas a expressão da proteína Ki-67 - concluiu que ProExC parece distinguir melhor lesões intraepiteliais de baixo e alto grau, enquanto MIB-I aparenta ser melhor no diagnóstico diferencial entre lesão intraepitelial e alterações reativas.

5 CONCLUSÃO

As evidências científicas sobre os marcadores moleculares avaliados se mostram promissoras e revelam como as estratégias para conter o avanço do câncer cervical têm evoluído para encontrar formas de facilitar o reconhecimento de mulheres que estão em maior risco de desenvolver a doença. Eles funcionam como ferramentas localizadoras, ajudando o citologista a localizar células potencialmente anormais. O índice de positividade desses marcadores, principalmente em relação às lesões intraepiteliais de alto grau, é significativo, e isso agrega maior sensibilidade ao exame citológico. A detecção dessas moléculas pode fornecer informações úteis sobre a progressão da doença, principalmente na triagem de mulheres jovens que apresentam uma infecção por HPV ou um quadro de displasia leve, ajudando a reduzir o número de encaminhamentos para colposcopia e biópsia.

REFERÊNCIAS

- ALSHENAWY, H. Alsaed; Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesions: potencial utility in diagnosis and prognosis. **Pathol Res Pract.**, Atlanta, v. 210, n. 12, p. 916-921, dez. 2014.
- ASTBURY, K.; MARTIN, C. M.; RING, M.; PILKINGTON, L.; BOLGER, N.; SHEILS, O. M.; O'LEARY, J. J. Future molecular aspects of cervical cytology. **Curr. diagn. pathol.**, Philadelphia, v. 12, n. 2, p. 104-113, 2006.
- BECCATI, M. D.; BURIANI, C.; PEDRIALI, M.; ROSSI, S.; NENCI, I. Quantitative detection of molecular markers ProEx C (minichromosome maintenance protein 2 and topoisomerase IIa) and MIB-1 in liquid-based cervical squamous cell cytology. **Cancer Cytopathol.**, Hoboken, v. 114, n. 3, p. 196-203.
- CAROZZI, F. et al. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. **Lancet Oncol.**, New York, v. 9, n. 10, p. 937-945, out. 2008.
- CAROZZI, F. et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: A prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. **Lancet Oncology**, New York, v. 14, n. 2, p. 168-176, dez. 2012.
- DENTON, K. J.; BERGERON, C.; KLEMENT, P.; TRUNK, M. J.; KELLER, T.; RIDDER, R. The sensitivity and specificity of p16INK4a cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL Pap cytology results. **Am J Clin Pathol.**, USA, v. 134, n. 1, p. 12-21, 2010.
- DEPUYDT, C. E.; MAKARA, P.; RUYMBEKE, M. J.; BENOY, I. H.; VERECKEN, A. J.; BOGERS, J. J. BD-ProExC as adjunct molecular marker for improved detection of CIN2 + after HPV primary screening. **Cancer Epidemiol Biomark Prev.**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 628-635, abr. 2011.
- DONÀ, M. G.; VOCATURO, A.; GIULIANI, M.; RONCHETTI, L.; ROLLO, F.; PESCARMONA, E.; CAROSI, M.; VOCATURO, G.; BENEVOLO, M. p16/Ki-67 dual staining in cervicovaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. **Gynecol Oncol.**, v. 126, n. 2, p. 198-202, maio 2012.
- EKALAKSANANAN, T.; PIENTONG, C.; SRIAMPORN, S.; KONGYINGYONES, B.; PENGSA, P.; KLEEBKAOW, P.; KRITPETCHARAT, O.; PARKIN, D. M. et al. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. **Gynecol Oncol.**, USA, v. 103, n. 1, p. 62-66, fev. 2006.
- HALLOUSH, R. A.; AKPOLAT, I.; ZHAI, Q. J.; SCHWARTZ, M. R.; MODY, D. R. Comparison of ProEx C with p16INK4a and Ki-67 immunohistochemical staining of cell blocks prepared from residual liquid-based cervicovaginal material: A pilot study. **Cancer Cytopathol.**, Hoboken, v. 114, n. 6, p. 474-480, dez. 2008.
- IKENBERG, H.; BERGERON, C.; SCHMIDT, D.; GRIESSER, H.; ALAMEDA, F.; ANGELONI, C.; BOGERS, J.; DACHEZ, R.; DENTON, K.; HARIRI, J.; KELLER, T.; DOEBERITZ, M. von K.; NEUMANN, H.; PUIG-TINTORE, L. M.; SIDERI, M.; REHM, S.; RIDDER, R. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results of the PALMS study. **J Natl Cancer Inst.**, Oxford, v. 105, n. 20, p. 1550-1557, out. 2013.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estatísticas do Câncer.** Rio de Janeiro, 1996-2015, Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 22 maio 2015.
- KURSHUMLIU, F.; THORNS, C.; GASHI-LUCI, L. p16INK4A in routine practice as a marker of cervical epithelial neoplasia. **Gynecol. Oncol.**, USA, v. 115, n. 1, p. 127-13, jul. 2009.
- MEYER, J. L.; HANLON, D. W.; ANDERSEN, B. T.; RASMUSSEN, O. F.; BISGAARD, K. Evaluation of p16INK4a expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK4a assay: Correlation with biopsy follow-up results. **Cancer Cytopathol.**, Hoboken, v. 111, n. 2,

p. 83-92, abr. 2007.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat Rev Cancer**, London, v. 10, n. 8, p. 550-560, ago. 2010.

OZAKI, S.; ZEN, Y.; INOUE, M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions. **Hum Pathol.**, Madison, v. 42, n. 7, p. 1007-1012, out. 2010.

PETRY, K. U.; SCHMIDT, D.; SCHERBRING, S.; LUYTEN, A.; REINECKE-LÜTHGE, A.; BERGERON, C.; KOMMOSS, E.; LONING, T.; ORDI, J.; REGAUER, S.; RIDDER, R. Triaging pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 dual-stained cytology. **Gynecol. Oncol.**, USA, v. 121, n. 3, p. 505-509, mar. 2011.

PINTO, A. P.; CRUM, C. P.; HIRSCH, M. S. Molecular markers of early cervical neoplasia. **Diagn. Histopathol.**, Amsterdam, v. 16, n. 10, p. 445-454, 2010.

SAHEBALI, S.; DEPUYDT, C. E.; BOULET, G. A. V.; ARBYN, M.; MOENECLAËY, L. M.; VEREËCKEN, A. J.; VAN MARCK, E. A.; BOGERS, J. J. Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. **Int J Cancer**, Geneva, v. 118, n. 5, p. 1254-1260, 2006.

SHIDHAM, V. B.; MEHROTRA, R.; VARSEGI, G.; D'AMORE, K. L.; HUNT, B.; NARAYAN, R. p16 immunocytochemistry on cell blocks as an adjunct to cervical cytology: potential reflex testing on specially prepared cell blocks from residual liquid-based cytology specimens. **Cytojournal**, USA, v. 8, n. 1, jan. 2011.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JERNAL, A. Global Cancer Statistics, 2012. **CA cancer j clin**, Atlanta, v. 65, n. 2, p. 87-108, mar./abr. 2015.

UIJTERWAAL, M. H.; WITTE, B. I.; VAN KEMENADE, F. J.; RIJKAART, D.; RIDDER, R.; BERKHOF, J.; BALFOORT-VAN DER MEIJ, G. A. M. A.; BLEEKER, M. C. G.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Triaging borderline/mild dyskaryotic Pap cytology with p16/Ki-67 dual-stained cytology testing:

cross-sectional and longitudinal outcome study. **Br J Cancer**, London, v. 110, n. 6, p. 1579-1586, jan. 2014.

WENTZENSEN, N.; BERGERON, C.; CAS, F.; VINOKUROVA, S.; DOEBERITZ, M. Von K. Triage of women with ASCUS and LSIL cytology: use of qualitative assessment of p16INK4a positive cells to identify patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer Cytopathol.**, Hoboken, v. 111, n. 1, p. 58-66, fev. 2007.

WENTZENSEN, N.; KLUG, S. J. Early Detection of Cervical Carcinomas: finding an overall approach. **Dtsch Arztebl Int.**, Cologne Germany, v. 105, n. 37, p. 617-622, 2008.

WENTZENSEN, N.; SCHWARTZ, L.; ZUNA, R. E.; SMITH, K.; MATHWES, C.; GOLD, M. A.; ALLEN, A.; ZHANG, R.; DUNN, S. T.; WALKER, J. L.; SCHIFFMAN, M. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. **Clin cancer res.**, Philadelphia, v. 18, n. 15, p. 4154-4162, 2012; 18(15): 4154-62, ago. 2012.

WRIGHT JR., T. C.; KUHN, L. Alternative approaches to cervical cancer screening for developing countries. **Best pract res clin obstet gynaecol.**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 197-208, 2012.

Recebido: 13 de dezembro de 2015

Revisado: 05 de abril de 2016

Aceito: 20 de abril de 2016