

CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p16^{INK4a} E O GRAU DE NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL ANAL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA¹

CORRELATION BETWEEN EXPRESSION OF p16^{INK4a} PROTEIN AND DEGREE OF ANAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (AIN): A SYSTEMATIC REVIEW

Maria Julliana Galvão NUNES², Guacyra Magalhães PIRES², Darley de Lima Ferreira FILHO², Adrya Lúcia Peres Bezerra de MEDEIROS³ e Nicodemus Teles de PONTES-FILHO⁴

RESUMO

Objetivo: identificar pela revisão sistemática a expressão da proteína p16^{INK4a} nos diferentes graus de neoplasias intra-epiteliais anais (NIA). **Método:** revisão sistemática de pesquisa nas bases de dados: PubMed, MedLine Old, MedLine, LILACS, SciELO e Science Direct. Foram excluídos artigos de revisão e que não correlacionavam a expressão da p16^{INK4a} com o grau de NIA. **Resultados:** foram encontrados 483 artigos, dos quais 223 na PubMed, 151 na Medline, 34 na Medline Old, 3 no Lilacs e 72 na Science Direct. Apenas cinco artigos foram selecionados baseados no critério de inclusão e exclusão. **Conclusão:** a proteína p16^{INK4a} utilizada como marcador mostra-se eficaz para o diagnóstico de NIA, principalmente em lesões anais de alto grau.

Descritores: imunistoquímica, p16^{INK4a}, neoplasia intra-epitelial anal, revisão sistemática.

INTRODUÇÃO

Há uma crescente incidência de câncer anal em países ocidentais, no entanto os dados são limitados quanto a sua causa primária, a infecção do canal anal pelo Papillomavirus humano (HPV)¹. As lesões intra-epiteliais do canal anal têm sido encontradas em número elevado nos pacientes masculinos homossexuais HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida) negativo² e em mulheres HIV negativo, cuja explicação pode estar relacionada a três fatores: infecção por vírus dos subtipos oncogênicos, maior número de coitos anais que o relatado e contaminação oriunda de infecção genital^{3,4}. Esta incidência atinge proporções epidêmicas nos homossexuais masculinos (35 casos por 100.000 habitantes), sendo ainda mais alarmante na população com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)⁵.

O tipo histológico mais comum do câncer anal, o carcinoma de células escamosas (CCE), surge em áreas de neoplasias intra-epiteliais anais (NIA) de alto grau, como consequência de infecção crônica pelo HPV e parece ter relação com alta carga do vírus na infecção⁶.

A transformação maligna no canal anal depende da integração dos genes E6 e E7 do HPV oncogênico ao genoma do hospedeiro, à persistência da infecção, à baixa de imunidade celular e consequente expressão das proteínas E6 e E7. Essas proteínas são produtos de oncogenes virais capazes de interagir com proteínas controladoras do ciclo celular, p53 e pRb^{7,8}. Em decorrência dessa interação é ativado um processo de retroalimentação negativo que resulta na expressão da proteína inibitória dos complexos de quinases dependentes de ciclina, a p16^{INK4a}⁹, e a célula é conduzida à transformação, imortalização e,

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia - UFPE

² Mestrando do Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco

³ Doutoranda em Biologia da Saúde pelo Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE.

⁴ Doutor em Nutrição pela Universidade Federal de Pernambuco.

posteriormente, ao câncer⁷.

A imunomarcção da proteína p16^{INK4a} é uma ferramenta eficaz na rotina laboratorial da patologia anal contribuindo para uma melhor precisão do diagnóstico de NIA, especialmente em casos limítrofe¹⁰. Poucas medidas na Medicina diagnóstica tiveram tanto impacto quanto a introdução, nas práticas de laboratório clínico, dos imunoenaios para a determinação de proteínas relacionadas a tumores, também classificadas como marcadores tumorais¹¹.

OBJETIVO

Realizar uma revisão sistemática sobre a expressão da proteína p16^{INK4a} nos diferentes graus de neoplasias intra-epiteliais anais (NIA).

MÉTODO

Revisão sistemática realizada no período de setembro de 2010 a outubro de 2010, a partir das bases de dados online: PUBMED (U. S. National Library of Medicine), MEDLINE OLD, (Literatura Internacional em Ciências da Saúde – até 1996), MEDLINE (Literatura Internacional em Ciências da Saúde, a partir de 1997), LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Electronic Library Online) e SCIENCE DIRECT, utilizando-se como descritores (DeCs): imunoistoquímica e neoplasias de ânus, e como termos livres (TL): biomarcadores, p16^{INK4a}, neoplasia intra-epitelial anal, todos com seus correspondentes em inglês. Estes foram cruzados nas bases de dados da seguinte forma: imunoistoquímica e neoplasias de ânus; biomarcadores e neoplasia intra-epitelial anal e p16^{INK4a} e neoplasias de ânus. Foram incluídos artigos originais nos idiomas: português, inglês e espanhol. Excluídos artigos de revisão, monografias,

dissertações e livros, artigos que não correlacionavam a expressão da p16^{INK4a} com o grau de NIA, que utilizavam como método a imunocitoquímica e aqueles nos quais os pacientes haviam recebido tratamento prévio. Foram também pesquisadas as referências dos artigos incluídos. Não houve limitação do período de publicação dos artigos pesquisados.

RESULTADOS

Inicialmente foram encontrados 483 artigos, dos quais 223 foram na PubMed, 151 na Medline, 34 na Medline Old, 3 no Lilacs e 72 na Science Direct. Foram excluídos 472 artigos por não terem relação com o tema ou serem duplicatas. Após a leitura do artigo original foram selecionados cinco artigos atendendo aos critérios pré-estabelecidos.

Optou-se por considerar as seguintes variáveis nos artigos selecionados: autor/ano, amostragem, métodos, resultados e conclusões (Tabela I).

DISCUSSÃO

A detecção de alterações celulares que podem ser originadas pela expressão desregulada das oncoproteínas virais pode caracterizar marcadores envolvidos na progressão tumoral e, desta forma, contribuir para a identificação de grupos de células que apresentem maior risco de progressão para o câncer. Na neoplasia associada ao HPV a desregulação da expressão do oncogene viral E7 interfere na regulação da rede de ciclinas celulares, levando a superexpressão da proteína p16^{INK4a}¹⁶, uma proteína inibitória dos complexos de quinases dependentes de ciclina⁹, que regula a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular¹⁶.

TABELA I – Estudos que analisaram a expressão da p16INK4a em Neoplasia Intra-epitelial Anal (NIA)

AUTOR/ANO	AMOSTRAGEM	MÉTODOS	RESULTADOS	CONCLUSÕES
Bean et al, 2009 ^{1,2}	77 biópsias anal	Diagnóstico H&E IHC: Coloração nuclear e/ou citoplasmática para p16 ^{INK4a} < 5% - negativa. Lesões NIA I/HPV: reatividade para p16 irregular ou descontínua 1/3 basal do epitélio escamoso. Lesões de alto grau: reatividade difusa ou contínua na camada basal/parabasal nos 2/3 superiores ou mais.	Casos: 25 normal/reactiva, 28 NIA I, 3 NIA II e 13 NIA III	Acredita-se que p16INK4a é melhor usado para casos desafiadores, onde o diagnóstico diferencial situa-se entre a metaplasia escamosa atípica e NIA
Kreuter et al, 2009 ^{1,0}	49 espécimes de mucosa anal normal e displasia de alto e baixo grau	NIA graus histológicos: 1/3 inferior- NIA I, menor 2/3- e III de alto grau. IHC: Coloração nuclear com ou sem coloração citoplasmática - positiva para p16 ^{INK4a} . Padrões de coloração: irregular (>10% das células escamosas espalhadas marcadas); Banda (>90% contíguo de células escamosas marcadas).	Mucosa anal normal - imunocoloração ausente ou apenas positiva em poucas células isoladas. NIA de baixo grau - expressão irregular ou em 5% ou menos das células. NIAs de alto grau - positivas para p16 ^{INK4a} 70,8% - padrão de banda e expressão entre 55% a 86% das células epiteliais.	p16 ^{INK4a} como auxiliar no diagnóstico de NIA de alto grau em homossexuais masculinos HIV-positivo. Pode ser usada em indivíduos HIV negativos com displasia associada ao HPV.
Bernard et al, 2008 ^{1,3}	108 biópsias anal consecutivas e 25 espécimes consecutivos de hemorroidectomia	NIA I, II, ou III de acordo com grau de displasia. IHC: intensidade de p16 ^{INK4a} nuclear: 1+ (intensidade fraca) e 2+ e 3+ (intensidade forte). Padrão nuclear foi incluído: raro, desigual, contíguo, basal, basal-superfície e superfície.	100% de NIA II e III - fortemente positivos (2 ou 3+) para p16 ^{INK4a} nuclear e 80% para NIA I. 98% dos casos de NIA III, 100% de NIA II e 28% dos NIA I - padrão de coloração contíguo - 100% NIA III/II e 48% NIA I forte intensidade nuclear. 33% NIA negativos foram positivos para p16 ^{INK4a} com menor intensidade do que para NIA II/III.	A utilidade do diagnóstico da IHC para p16INK4a é maior em NIA II e III e auxilia no dilema do diagnóstico de NIA de alto grau versus zona de transição do epitélio benigno.
Bean et al, 2007 ^{1,4}	75 espécimes/55 pacientes	Grau de displasia: menos de 1/3- NIA I; 2/3 – NIA II; carcinoma <i>in situ</i> com células displásicas ocupando mais de 1/3 – NIA III. IHC: Padrão da coloração de p16 ^{INK4a} : negativo, descontínuo (focal), ou difuso/contínuo. Positiva: presença de reatividade nuclear e/ou citoplasmática. Negativa: coloração < 5% das células.	47% dos casos - negativo para displasia; 31% - displasia de baixo grau; 23% - displasia de alto grau. Coloração nuclear e/ou citoplasmática observada na maioria (74%) dos casos de NIAs de baixo e alto grau. NIA de baixo grau: coloração focal ou desigual NIA de alto grau: difusa.	Em NIA de alto grau o padrão de coloração para p16 tende a ser de forma difusa. A p16 mostrou-se um marcador sensível e confiável para diagnosticar NIA de alto grau.
Walts et al, 2006 ^{1,5}	104 biópsias anal de 74 pacientes e biópsia cervical positiva	Casos: 37 negativos, 12 condilomas, 14 NIA I (displasia leve), 25 NIA II (displasia moderada) e 16 NIA III (grave displasia/ CIS). IHC: Coloração nuclear e/ou nuclear e citoplasmática em >10% das células escamosas - positivo; Apenas citoplasmática - inespecífica negativa Padrões de coloração: em banda (>90% das células escamosas contíguas foram coradas) ou manchada (>10% das células com coloração positiva espalhada).	83% de NIA de alto grau (NIA II e III) e 21% de NIA I – padrão de banda. Padrão de banda nos casos de NIA I foram nível I. Padrão em manchas: células positivas distribuídas desigualmente em vários níveis do epitélio e não correlacionaram com o diagnóstico. Em todos os casos NIA de alto grau com padrão de banda, > 25% das células escamosas coraram positivas.	p16 é um complemento muito útil a morfologia no diagnóstico histológico na gradação de NIA associada ao HPV, pode melhorar a precisão do diagnóstico patológico e deve ser um componente na avaliação de biópsias que são difíceis de avaliar NIA apenas pela morfologia.

(Abreviaturas: IHC: Imunoistoquímica; NIA: Neoplasia Intra-epitelial Anal; HPV: Papillomavirus humano; HIV: Virus da Imunodeficiência Adquirida)

Observando o ano de publicação dos artigos selecionados, nota-se que estes são bastante recentes, afirmando que a expressão da proteína em amostras anais foi pouco estudada em décadas anteriores. A maioria dos estudos que verificam a expressão da proteína p16^{INK4a} utilizam amostras de colo uterino⁹, o que pode justificar o baixo número de artigos encontrados relacionados ao tema.

Nos cinco artigos selecionados a maioria dos estudos utilizaram número da amostra semelhantes, com exceção do estudo de Kreuter et al¹⁰ que utilizou uma amostragem menor. Apenas um estudo¹⁵ utilizou biópsia cervical positiva como controle. Alguns estudos¹²⁻¹⁴ avaliaram amostras provenientes de hemorroidectomia ou casos de alterações de células escamosas reativas como padrão negativo para reatividade da proteína p16^{INK4a}, visto que esta proteína não é expressa em epitélio normal, células proliferativas e lesões inflamatórias.

Estudo utilizando a proteína p16^{INK4a} como marcador mostra um resultado com 75% de sensibilidade e 100% de especificidade no diagnóstico de NIA¹⁵. Alguns estudos que correlacionam a expressão desta proteína com grau de NIA apontam esta proteína como um biomarcador eficaz principalmente para diagnosticar NIA de alto grau^{13,14}. Kreuter et al¹⁰, afirmam que a expressão da proteína p16^{INK4a} não é, significativamente, diferente entre a mucosa anal normal e aquela com NIA de baixo grau. Estes dados são concordantes com os de outros autores que analisando casos negativos de NIA encontraram positividade para p16^{INK4a}, embora em menor intensidade quando comparados aos de NIA positivos¹⁴.

Também foi relatado a superexpressão de p16^{INK4a} em casos de carcinoma de células escamosas¹⁷. De acordo com Walts et al¹⁵, a superexpressão da p16^{INK4a} em lesões intra-epiteliais anais, cervicais e vulvar associadas ao HPV e carcinomas pode ser consequência da integração do DNA do HPV de alto risco a célula hospedeira.

Um estudo analisando homossexuais masculinos

HIV positivos, grupo que apresenta alto risco para o desenvolvimento de displasia anal, revelou que a p16^{INK4a} auxilia no diagnóstico de NIA de alto grau, indicando a proteína como biomarcador adicional efetivo na rotina da patologia anal, melhorando a precisão no diagnóstico de NIA¹⁰.

Em relação ao padrão de coloração encontrado nos casos de NIA, os autores revelam um padrão em banda ou difuso com maior intensidade para os casos de NIA de alto grau (NIA II e III), já nos casos de NIA de baixo grau (NIA I) a marcação apresenta-se como focal ou desigual e, mesmo quando mostra padrão em banda, esta é pouco intensa^{10,14,15}. As lesões anais de alto grau, geralmente, apresentam reatividade para p16^{INK4a} de forma contínua, ao contrário das lesões de baixo grau. Isso se deve ao fato de que um maior número de células nas lesões de alto grau estão envolvidas no processo de malignidade e conseqüentemente são marcadas mais intensamente pela proteína.

Observou-se que na maioria dos artigos analisados^{10,12,14,15} foi verificado o grau histológico de NIA. Nestes não se pôde verificar uma concordância quanto ao número de casos de NIA de baixo grau e NIA de alto grau, pois nos estudos de Bean et al¹² e Bean et al¹⁴ foi observado um maior número de casos de NIA de baixo grau (NIA I), no entanto, pode-se levar em consideração que ambos estudos fazem parte do mesmo grupo de pesquisa e ambos divergem dos estudos de Kreuter et al¹⁰ e Walts et al¹⁵ que mostram um número de casos de NIA de alto grau (NIA II e III) consideravelmente maiores que os casos de NIA de baixo grau.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme revisão sistemática, a proteína p16^{INK4a} utilizada como marcador mostra-se eficaz para o diagnóstico de NIA, principalmente, em lesões anais de alto grau.

SUMMARY

CORRELATION BETWEEN EXPRESSION OF p16INK4A PROTEIN AND DEGREE OF ANAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (AIN): A SYSTEMATIC REVIEW

Maria Julliana Galvão NUNES, Guacyra Magalhães PIRES, Darley de Lima Ferreira FILHO, Adrya Lúcia Peres Bezerra de MEDEIROS e Nicodemos Teles de PONTES-FILHO

Objective: to identify through a systematic review the expression of p16^{INK4a} protein in different degrees of anal intraepithelial neoplasia (AIN). **Method:** the review was realized through research on databases PubMed, MedLine Old, MedLine, LILACS, SciELO e Science Direct. Review articles and the ones without correlation between the expression the p16^{INK4a} with the level of AIN were excluded. **Results:** it were found 483 articles, which 223 in PubMed, 151 in Medline, 34 in Medline Old, 3 in Lilacs and 72 in Science Direct. Only five articles were selected based on inclusion and exclusion criteria. **Conclusion:** the p16^{INK4a} protein used as a marker has shown to be effective for diagnostic of AIN, mainly in high-grade anal lesions.

REFERÊNCIAS

1. Giuliano, AR; Anic, G; Nyitrai, AG. Epidemiology and pathology of HPV disease in males. *Gynecologic Oncology*. v. 117, p. S15–S19. 2010.
2. McCloskey, JC; Metcalf, C; French, MA; Flexman, JP; Burke, V; Beilin, LJ. The frequency of high-grade intraepithelial neoplasia in anal/perianal warts is higher than previously recognized. *Int J STD AIDS*. v. 18, n. 8, p. 538-542. 2007.
3. Massad, LS; Riestler, KA; Anastos, KM; Fruchter, RG; Palefsky, JM; Burk, RD; Burns, D Greenblatt, RM; Muderspach, LI; Miotti, P. Women's Interagency HIV Study Group. Prevalence and predictors of squamous cell abnormalities in Papanicolaou smears from women infected with HIV-1. *JAIDS - Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. v.21, n.1, p. 33-41. May 1999.
4. Chang, GJ; Berry, JM; Jay, N; Palefsky, JM; Welton, ML. Surgical treatment of high-grade anal squamous intraepithelial lesions. *Dis Colon Rectum*, v.45, n.4: p.453-459. 2002.
5. Nadal, SR; Manzione, CR. Os agentes sexualmente transmissíveis e o câncer anorretal. *Rev Bras Coloproct*, v.24, n.3, p.274-277. 2004.
6. Fox, PA. Human papillomavirus and anal intraepithelial neoplasia. *Curr Opin Infect Dis*. v. 19, n. 1, p.62-6. Feb 2006.
7. Souto, R; Falhari, JPB; Cruz, AD. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v.51, n. 2, p. 155-160. 2005.
8. Steenberg, RD; De Wilde, J; Wilting, SM; Brink, AA; Snijders, PJ; Meijer, CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol*. v. 32, Suppl 1, p. S25-33. 2005.
9. Khleif, SN; De Gregori, J; Yee, CL; Otterson, GA; Kaye, FJ; Nevins, JR; Howley, PM. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 93, n. 9, p. 4350-4. 1996.
10. Kreuter, A; Jesse, M; Potthoff, A; Brockmeyer, NH.; Gambichler, T; Stücker, M; Bechara, FG; Pfister, H. Expression of proliferative biomarkers in anal intraepithelial neoplasia of HIV-positive men. *American Academy of Dermatology*. v. 10. 2009.
11. Pradal, M; Menezes, AM; Di Dio, R. Marcadores tumorais. *LAES & HAES*. v. 30, p. 146-182. 2004.
12. Bean, SM et al. p16 Improves Interobserver agreement in Diagnosis of Anal Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, vol 13, n. 3, 2009, 145-153.
13. Bernard, JE; Butler, MO; Sandweiss, L; Weidner, N. Anal Intraepithelial Neoplasia: Correlation of Grade With p16INK4a Immunohistochemistry and HPV In Situ Hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. V. 16, n. 3, May 2008.

14. Bean, SM; Eltoun, I; Horton, DK; Whitlow, L; Chhieng, DC. Immunohistochemical Expression of p16 and Ki-67 Correlates With Degree of Anal Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol*. V. 31, n. 4, April 2007.
15. Walts, AE; Lechago, J; Bose, S. p16 and Ki67 Immunostaining is a Useful Adjunct in the Assessment of Biopsies for HPV-Associated Anal Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol*. v. 30, p. 795-801. 2006.
16. Von Knebel Doeberitz, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*. v. 38, n. 33, p. 2229-42. 2002.
17. Lu, DW; El-Mofty, SK; Wang, HL. Expression of p16, Rb, and p53 Proteins in Squamous Cell Carcinomas of the Anorectal Region Harboring Human Papillomavirus DNA. *Mod Pathol*, V. 16, n. 7, p. 692–699, 2003.

Endereço para correspondência

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Patologia

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE

E-mail: julliana_gnunes@yahoo.com.br

Recebido em 26.01.2011 – Aprovado em 23.03.2011