

MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS DE LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DO COLO UTERINO ASSOCIADAS AO HPV: O PAPEL DA PROTEÍNA DE SUPRESSÃO TUMORAL p16^{INK4A}

IMMUNOHISTOCHEMISTRY MARKERS FOR LESIONS PRECEDING HPV-INDUCED CERVICAL CANCER: THE ROLE OF TUMORAL SUPPRESSION p16^{INK4A} PROTEIN

José Eleutério Junior¹, Paulo C Giraldo², Ana K Gonçalves³

RESUMO

A relação entre o HPV e as lesões intra-epiteliais escamosas cervicais está bem estabelecida. O mecanismo de ação que o vírus parece utilizar para causar a transformação está associado a dois genes do HPV, E6 e E7. O gene E7 tem um papel importante induzindo alterações na célula hospedeira associadas à proteína do retinoblastoma (pRb) e o fator de transcrição E2F. Quando o fenômeno induzido pelo E7 do HPV ocorre, há expressão da proteína p16^{INK4a} que pode ser detectada por imunistoquímica. Recentes trabalhos mostram a importância do uso de p16^{INK4a} como marcador de transformação celular induzida pelo HPV e a sua utilidade clínica na prática, principalmente ajudando no diagnóstico de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau em biópsias. Esta revisão pretende fornecer ao leitor uma idéia atualizada de como alguns marcadores celulares podem contribuir para o diagnóstico e o prognóstico das neoplasias intra-epiteliais cervicais.

Palavras-chave: p16^{INK4a}, HPV, lesão intra-epitelial escamosa, câncer de colo uterino, DST

ABSTRACT

The HPV and cervical squamous intra-epithelial neoplasia relation is established. The mechanisms used by the virus which causes the transformation of the squamous intra-epithelial are associated to the E6 and E7 HPV genes

The E7 gene has an important role inducing the host cell changes which are related to the retinoblastoma protein and E2F transcription factor. When the phenomenon induced by the E7 occurs, there is the expression of the p16^{INK4a} protein which can be detected by immunohistochemistry. Recent studies have shown the importance of the use of the p16^{INK4a} as a marker for cellular transformation induced by HPV and its clinical use in practice, mainly helping in the diagnosis of high grade squamous intra-epithelial lesions in biopsies. This revision intends to provide to the reader an update to the understanding of how cellular markers can contribute to improve the differential diagnosis of the squamous intra-epithelial neoplasia and its prognosis.

Keywords: p16^{INK4a}, HPV, scamous intra-epithelial lesions, cervical cancer, sexually transmitted disease

ISSN: 0103-0465

DST – J bras Doenças Sex Transm 18(1): 62-65, 2006

INTRODUÇÃO

O vírus do papiloma humano (HPV) é identificado em praticamente todos os casos de câncer escamoso do colo uterino, sendo o HPV 16, o tipo predominante nas regiões geográficas estudadas (43% a 65%).¹ A identificação de um HPV de alto risco nos cânceres de colo não implica em dizer que seja o fator determinante no processo evolutivo das lesões pré-neoplásicas. Seguramente, existe a necessidade da presença de co-fatores essenciais para que a malignização se instale. O status imunológico do hospedeiro e a persistência de HPV de alto risco, além do hábito do tabagismo, o início precoce de vida sexual e a história de múltiplos parceiros são co-fatores importantes que parecem ter papel decisivo no processo.^{2,3, 4}

A interação vírus-hospedeiro e as possíveis transformações a partir daí é algo que vem sendo exaustivamente estudado. Considera-se que a infecção viral se instala nas células da camada basal do epitélio escamoso, através de microtraumas do epitélio, passando a ter replicações virais que acompanham a evolução celular até a superfície epitelial. Na camada basal a replicação viral é não-produtiva, ou seja, é mínima, não se produzindo alterações identificáveis histologicamente (coilocitose e atipias celulares). Já nas células escamosas diferenciadas das camadas supra-basais ocorre uma replicação do tipo produtiva com evidentes manifestações morfológicas. O HPV pode permanecer nas células hospedeiras nas seguintes condições: forma epissomal (o genoma viral fica associado ao genoma da célula em um certo ponto) e forma integrada (o genoma do HPV incorpora-se ao da célula hospedeira).

De maneira geral as formas não integradas (epissomais) estão associadas a uma infecção produtiva, em que o vírus se replica acompanhando o amadurecimento celular. No entanto, embora se considere que a possibilidade de transformação celular evolutiva para o câncer ocorra na forma integrada, em algumas oportuni-

¹Aluno de pós-graduação nível de Doutorado do Departamento de Tocoginecologia/FCM da Universidade Estadual de Campinas

²Professor Associado, Livre-Docente do Departamento de Tocoginecologia/FCM da Universidade Estadual de Campinas

³Professora Adjunta Doutora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

des, principalmente associadas ao HPV 16, pode haver esta transformação na forma epissomal, porém não-produtiva do vírus.^{5,6,7,8}

Estudando as lesões intra-epiteliais escamosas não há ainda como identificar precisamente os fatores prognósticos que poderiam identificar aquelas com maiores possibilidades de evolução. Além disso, a subjetividade empregada nos exames anatomopatológicos tem levado a questionamento sobre o seu uso como um padrão-ouro para o diagnóstico destas lesões.⁹

Recentemente, tendo-se em conta esta falta de parâmetros confiáveis, marcadores de proliferação celular (MIB-1) e supressão tumoral (p16^{INK4a}) vêm sendo testados em busca de indicadores mais confiáveis na identificação de quais lesões pré-neoplásicas teriam maior potencial desfavorável¹⁰⁻¹².

O HPV contém um DNA em dupla fita, circular que mede cerca de 8.000 pares de bases^{4,13} no qual estão presentes as regiões gênicas E (*early*) e L (*late*). A região E está relacionada a replicação do DNA viral, controle de transcrição, maturação, alteração da matriz celular e estímulo de proliferação, além da transformação celular. Neste último fenômeno estão envolvidos E6 e E7^{7,14}, que são os principais transformadores do HPV e estão diretamente envolvidos na indução de proliferação benigna e transformação maligna nas células do hospedeiro.¹⁵ Geralmente o câncer se desenvolve como consequência de alterações genéticas com ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor. Os mais assiduamente estudados nas relações do HPV com seu potencial oncogênico têm sido o p53 e o Rb. O papel dos produtos destes genes é regular ao ciclo celular por controle da transcrição de genes celulares envolvidos na progressão do ciclo e na proliferação celular.⁶

p53

A proteína nuclear p53, denominada “guardião do genoma”, tem como principal efeito supressor tumoral a ativação transcripcional dos genes que mantêm a estabilidade genômica. Células com p53 mutado ou inativado perdem a habilidade de induzir ao bloqueio na fase G1 do ciclo celular ou à apoptose, em resposta a um dano de DNA. Isto resulta em uma instabilidade genética e mutações críticas para a oncogênese^{6,16}.

pRb

O produto do gene Rb, proteína nuclear pRb, interage com o fator de transcrição celular E2F na fase G1 do ciclo celular. Esta interação inibe a transcrição E2F induzida dos genes celulares envolvidos na proliferação e replicação de DNA, tais como timidina-quinase, c-myc, polimerase alfa entre outros. Mutações de Rb ou inativação de pRB causam proliferação celular descontrolada⁶.

A perda de função das vias pRb e p53 ocorre na maioria dos casos de cânceres humanos, ou até em todos. Fortes evidências genéticas, epidemiológicas e bioquímicas estabeleceram que suas proteínas seriam componentes de diferentes barreiras contra o câncer. Não só HPV de alto risco, mas também os de baixo risco

expressam E6 e E7; no entanto, só os primeiros codificam as oncoproteínas E6 (que inativam o p53) e E7 (que inativam o pRb).¹⁷

p16^{INK4a}

A relação entre pRb e E2F pode levar à ativação de quinases dependentes de ciclinas 4 e 6 (CDK4 e CDK6) que, por sua vez, levam à expressão de proteínas quinase associadas, encontrando-se a p16^{INK4a} entre elas^{14,18}.

A proteína do p16 age como supressora tumoral inibindo as quinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6), que regulam o ponto G1 de checagem do ciclo celular.^{19,20} Alterações em p16 e/ou pRb têm sido descritas em muitos cânceres incluindo melanomas,²¹ leucemias,²² linfomas,²³ neurofibromas,²⁴ retinoblastomas,²⁵ osteossarcomas e vários outros tumores malignos de cabeça e pescoço,²⁶ mama,^{27,28} pulmão²⁹ e próstata.³⁰

O p16 é detectado quando o gene Rb sofre mutação, sendo deletado ou inativado, e, contrariamente, esta proteína fica marcadamente reduzida ou ausente em linhas celulares e espécimes clínicos que contêm o gene Rb intacto. Ou seja, o marcador p16 não é expressado em epitélio normal, células proliferativas e lesões inflamatórias.^{27,31} Os dois mecanismos mais comuns de inativação de p16 são a deleção homozigótica ou a hipermetilação do gene.³¹

DISCUSSÃO

Nas lesões intra-epiteliais e no câncer de colo a alteração no p16 pode ter um papel primordial no desenvolvimento do tumor. Assim, a expressão do p16 torna-se um possível marcador para a diferenciação de lesões neoplásicas daquelas reativas ou hiperplásicas na cérvix.^{31,32} Desde que a expressão do p16^{INK4a} é controlada por pRb funcional, que está ligado à oncoproteína do E7 do HPV, a sobre-expressão de p16^{INK4a} pode representar um excelente biomarcador para células com expressão ativa de oncogenes de HPV.^{31,33}

Estudos sugerem um valor preditivo positivo de 88,7% do p16^{INK4a} para a positividade do HPV.³⁴ Outros trabalhos experimentais demonstraram a não sobre-expressão do p16 em linhagens celulares de cânceres cervicais, como também marcado aumento da expressão do p16 em células ectocervicais humanas imortalizadas pelo HPV 16 e 18. Sugerindo assim, que a inativação da cascata regulatória p16/ciclina D1/CDK4/pRb pelo HPV ocorre durante o passo de imortalização precoce na carcinogênese cervical, mas não durante a fase tardia de transformação, o que morfológicamente se traduziria como máxima expressão no carcinoma *in situ*, com uma redução no carcinoma invasor³¹.

Klaes *et al.*⁹ comparando diagnósticos histológicos de biópsias cervicais entre experientes patologistas observaram uma discordância diagnóstica para lesões tipo NIC 1 e NIC 2 e o uso de reação imunoistoquímica para o p16^{INK4a} reduziu esta discordância. O uso do marcador mostrou um valor preditivo positivo de 100% para as lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e de

Tabela 1 – Marcadores imunoistoquímicos mais estudados para gravidade e prognóstico das lesões epiteliais escamosas do colo de útero.

Marcador	Mecanismo	Utilidade
Ki-67 (MIB -1) ^{10, 33}	Alteração do ciclo celular	Positividade identifica atividade proliferativa Sugere prognóstico
p53 ^{11,18}	Mutação ou degradação do gene p53 via E6-HPV	Positividade sugere prognóstico
p16 ^{INK4a9,11,12,15,18,19, 22, 31, 34, 36}	Mutação (deleção homocigótica ou metilação) do gene Rb via E7-HPV	Positividade identifica lesão intra-epitelial escamosa de alto grau Sugere prognóstico
Ciclina E ³³	Alteração do ciclo celular	Dados experimentais indicam a direta relação com índice de ciclo celular

88% para as lesões de baixo grau. Dentre os casos de lesões de baixo grau, havia dois grupos. O primeiro, composto por lesões que simplesmente refletiam infecções agudas por HPV, ou seja, aquelas, com infecção em curso e replicação viral, mas com expressão de HPV de alto risco restrita nas células epiteliais diferenciadas (p16^{INK4a} negativo nas camadas basal e parabasal). E um segundo, com expressão de oncogene do HPV de alto risco desregulada (p16^{INK4a} positivo nas camadas basal e parabasal). Assim, parece que a progressão para lesões de mais alto grau preferencialmente ocorreria naqueles casos que possuem expressão de oncogene de HPV de alto risco ativado no compartimento basal do epitélio.⁹ Achados de Kalof *et al.*,³⁵ Volgareva *et al.*,³⁶ e Branca *et al.*¹⁸ também observaram uma positividade evolutiva para o marcador, embora com uma certa heterogeneidade nos resultados da marcação nos casos de neoplasia intra-epitelial cervical e carcinoma escamoso. Tsuda *et al.*¹⁷ observaram que 41,3% dos cânceres invasivos do colo do útero expressavam p16^{INK4a} contra 14,3% das lesões intra-epiteliais escamosas, permitindo-lhes concluir que há um aumento de anormalidades da via do Rb (assim, como do p53) com a progressão de lesão intra-epitelial para carcinoma.

CONCLUSÃO

Considera-se que do universo de mulheres infectadas pelo HPV, uma grande maioria obterá eliminação do vírus e apenas uma pequena parte deverá ser portadora de lesões com potencial evolução para invasão. O estudo de fenômenos da interação entre o HPV e a célula hospedeira tem levado à identificação de marcadores com possível associação com um maior risco evolutivo, tais como o MIB-1 e o p53.^{11,12,17} No entanto, os achados não permitem considerá-los de grande utilidade na prática diária.

O p16^{INK4a}, devido a sua expressão mais claramente associada ao mecanismo transformante viral parece que tende a ser um marcador a entrar na prática clínica no auxílio diagnóstico de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau, por vezes morfológicamente difíceis de serem diferenciadas de quadros reparativos intensos e de lesões de menor grau com importantes alterações reativas, bem como em uma provável identificação de lesões com maior potencial evolutivo para a invasão.^{2,9,11,12,32} A sua correla-

ção aqui descrita com a oncogênese do carcinoma cervical deve permitir melhores estudos sobre o seu papel e importância no processo evolutivo do câncer de colo e correlações com o efeito citopático do HPV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J *et al*. Prevalence of Human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:796-802.
2. Pfister H. Papel do Papilomavírus humano no câncer anogenital. In: Lörincz AT & Reid R. Clínicas Obstétricas e Ginecológicas da América do Norte – Papilomavírus humano I. Rio de Janeiro: Interlivros; 1996. p. 565-80.
3. Schiffman M, Castle Pe. Human papillomavirus – epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(1): 930-4.
4. Viscidi RP. Epidemiology of genital tract Human papillomavirus infections. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M. *Colposcopy: principles and practice*. 1 Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia 2002. p. 1-22.
5. Crum CP, Cibas ES, Lee KR. Pathology of early cervical neoplasia. Contemporary issues in surgical pathology, 1ª Ed v. 22. New York: Churchill Livingstone; 1997, 288 p.
6. Wieland U, Pfister H. Papillomaviruses in human pathology: epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. In: Gross GE & Barrasso R. *Human papillomavirus infection – a clinical atlas*. 1st Ed. Ulstein Mosby. Wiesbaden 1997. p. 1-20.
7. Villa LL. Aspectos moleculares da oncogênese por Papilomavírus. In: Bibbo M & Moraes AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 51-58.
8. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different level of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* 2004; 92:873-80.
9. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D *et al*. p16^{INK4a} immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Sur Pathol* 2002; 26: 1389-99.
10. Pirog EC, Baergen RN, Soslow RA, Tam D, Demattia AE, Chen YT, Isaacson C. Diagnostic accuracy of cervical low-grade squamous intraepithelial lesions is improved with MIB 1 immunostaining. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:70-5.
11. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16^{INK4a}, p14^{ARF}, p53 and proliferation cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Resear* 2004; 10:2407-14.
12. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A *et al*. Validation of p16^{INK4a} as a marker of oncogenic human Papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epid Bio Preven* 2004; 13:1355-60.
13. De Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Trop Microbiol Immunol* 1994;186:1-12

14. Gupta S, Takhar PP, Degenkolbe R, Koh CH, Zimmermann H, Yang CM et al. The Human papillomavirus type 11 and 16 E6 proteins modulate the cell cycle regulator and transcription cofactor TRIP-Br1. *Virology* 2003;317:155-164.
15. Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M. Induction of pRb degradation by the Human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16^{INK4a} – imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol*, 2001; 75:4705-12.
16. Isaka K, Nishi H, Osakabe Y, Miyata M, Hokamura M, Nakada T et al. Establishment of a HPV and p53-mutations-negative human cell line (CA) derived from a squamous carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2004; 92:15-21.
17. Tsuda H, Hashiguchi Y, Nishimura S, Kawamura N, Inoue T, Yamamoto K. Relationship between HPV typing and abnormality of 1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol* 2003; 91:476-85.
18. Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A et al. p16^{INK4a} expression is related to grade of CIN in a high-risk Human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23:354-65.
19. Lukas J, Petersen Bo, Holm K, Bartek J, Helin K. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16^{INK4a} –mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* 1996;16: 1047-57.
20. Ragione FD, Russo GL, Oliva A, Mercurio C, Mastropietro S, Pietra VD, Zappia V. Biochemical characterization of p16^{INK4a}- and p18-containing complexes in human cell lines. *J Biol Chem* 1996; 271:15942-49.
21. Pollock PM, Welch J, Hayward NK. Evidence for three tumor suppressor loci on chromosome 9p involved in melanoma development. *Canc Res* 2001;61: 1154-61.
22. Dalle JH, Fournier M, Nelken B. p16^{INK4a} immunocytochemical analysis is an independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:2620-3.
23. Villuendas R, Sanchez-Beato M, Martinez JC, Saez AI, Martinez-Delgado B, Garcia JF et al. Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. *Am J Pathol* 1998;153:887-97
24. Birindelli S, Perrone F, Oggionni M, Lavarino C, Pasini B, Vergani B et al.. Rb and TP53 Pathway alterations in sporadic and NF1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Lab Invest* 2001; 81:833-44.
25. Alexander K, Hinds PW. Requirement for p27^{KIP1} in retinoblastoma protein-mediated senescence. *Mol Cel Biol* 2001; 21:3616-31.
26. Doki Y, Imoto M, Han EK, Sgambato A, Weinstein IB. Increased expression of th p27^{KIP1} protein in human esophageal cancer cell lines that overexpress cyclin D1. *Carcinogen* 1997; 18:1139-48.
27. An HX, Beckmann MW, Reifengerber G, Bender HG, Niederacher D. Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 1999; 154:113-8.
28. Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI et al. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16^{INK4a} messenger RNA is a marker of poor prognosis. *Clin Cancer Resear* 2000; 6:2777-87.
29. Tam AS, Devereux TR, Patel AC, Foley JF, Maronpot RR, Massey TE. Perturbations of the INK4a/Arf gene locus in aflatoxin B1-induced mouse lung tumors. *Carcinogen* 2003; 24:121-32.
30. Li LC, Zhao H, Shiina H, Kane CJ, Dahiya R. Pgdb: a curated and integrated database of genesrelated to the prostate. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:291-293.
31. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with Human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998; 153:1741-7.
32. O'Neill, McCluggage. p16 expression in the female tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2006; 13:8-15.
33. Van De Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 92:40-6.
34. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D et al. Ki-67, cyclin E and p16^{INK4a} are complimentary surrogate biomarkers for Human papillomavirus - related cervical neoplasia. *Am J Sur Pathol* 2001; 25:884-91.
35. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16^{INK4a} immunoeexpression an HPV in situ hybridization signal patterns potencial markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2005;29:674-9.
36. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D et al. Protein p16 as a marker of dispastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2004; 4:58-68.

Endereço para correspondência:**PAULO CÉSAR GIRALDO**

Universidade Estadual de Campinas – Unicamp - Departamento de Tocoginecologia

Rua Alexander Fleming, 848, Campinas, SP. CEP: 13093-140.

Tel: 55 19 3788-9306

E-mail: giraldo@unicamp.br

Recebido em: 15/03/2006

Aprovado em: 22/05/2006