

Avaliação da expressão de Telomerase (hTert), Ki67 e p16^{ink4a} em lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau

Evaluation of Telomerase (hTert), Ki67 and p16^{ink4a} expressions in low and high-grade cervical intraepithelial lesions

ANA PAULA SZEZEPANIAK GOULART¹; MANOEL AFONSO GUIMARÃES GONÇALVES¹; VINICIUS DUVAL DA-SILVA¹.

R E S U M O

Objetivo: estudar a associação entre a graduação histológica das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC I, NIC II e NIC III) e a expressão imuno-histoquímica para p16^{ink4a}, hTert e Ki67, assim como, avaliar a relação destes marcadores com o risco de recorrência após tratamento cirúrgico. **Métodos:** estudo de coorte histórica de 94 mulheres portadoras de lesões intraepiteliais NIC I (baixo grau), NIC II e NIC III (altos graus), submetidas à conização ou à excisão eletrocirúrgica da zona de transformação. Todas as peças cirúrgicas foram avaliadas quanto à expressão imuno-histoquímica para p16^{ink4a}, hTert e Ki67. **Resultados:** a média de idade das pacientes foi 38,2 anos. Nas pacientes NIC I, a p16^{ink4a} estava ausente na maioria dos casos; nas pacientes NIC II ou I/II (associação de lesões de baixo e alto grau), observou-se frequência de p16^{ink4a} ≤ 10%. Nas pacientes NIC III, observou-se maior frequência de expressão de p16^{ink4a} > 50%. Na categoria NIC I, a maioria apresentava Ki67 ≤ 10% e baixa frequência de Ki67 > 50%. Na categoria NIC III houve menor número de pacientes com Ki67 ≤ 10%, sendo que a maior parte das pacientes tinha Ki67 ausente nos grupos NIC II e III. Não houve associação entre a expressão do marcador imuno-histoquímico hTert e a graduação histológica. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as expressões dos marcadores em pacientes com e sem recorrência. **Conclusão:** houve associação estatisticamente significativa apenas de p16^{ink4a} e Ki67 com a graduação histológica. A expressão dos marcadores em relação à recorrência da doença não foi estatisticamente significativa no período avaliado.

Descritores: Neoplasia Intraepitelial Cervical. Telomerase. Imuno-Histoquímica. Recidiva.

INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres (90% dos casos em países em desenvolvimento) e, no Brasil, corresponde a 9,3% das neoplasias ginecológicas. Mundialmente, são diagnosticados 500.000 novos casos por ano, sendo responsável por 250.000 mortes anuais¹. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) recomenda que o rastreamento citopatológico cervical seja feito a cada três anos após dois exames negativos consecutivos em pacientes com idades entre 25 e 64 anos, desde que as amostras sejam satisfatórias e representativas da junção escamo-colunar². A neoplasia maligna de colo uterino é precedida por uma longa fase de lesão precursora, comumente assintomática, caracterizada pelas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), e que pode perdurar por um período de dez a 20 anos.

Em 1976, Zur Hausen³ demonstrou a relação entre a infecção pelo vírus HPV e o surgimento de neoplasias do trato genital. A infecção é mais comum em

pacientes jovens, entretanto, comportamento sexual, idade, fumo, paridade e uso de contraceptivos são também fatores de risco para esta neoplasia¹. Por outro lado, nem todas as pacientes infectadas pelo vírus apresentam a mesma evolução da doença, já que tal comportamento está ligado a fatores ambientais, imunidade, genética da hospedeira e fatores celulares⁴. O uso de marcadores moleculares tem auxiliado o patologista na definição de casos duvidosos e na identificação de mulheres de alto risco para recorrência da doença após tratamento das neoplasias intraepiteliais cervicais⁵. A p16^{ink4a}, uma proteína supressora tumoral, está superexpressa nos casos de displasia, apresentando alta sensibilidade por correlacionar-se com a gravidade da displasia. Estudos atuais propõem que a p16^{ink4a} seja um biomarcador útil para lesões de alto risco e para prever progressão nas lesões de baixo risco. Estes trabalhos mostram uma associação significativa entre o grau de lesão cervical e a distribuição e a intensidade da expressão da p16^{ink4a}^{5,6}.

O Ki67 é um outro marcador celular de proliferação expresso em todos os estágios do ciclo celular,

1 - Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Serviço de Ginecologia e Patologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

exceto na fase G0, e que, apesar de não estar envolvido especificamente no processo carcinogênico cervical, tem um valor preditivo independente para graduar e avaliar progressão de doença⁷.

A telomerase é um complexo enzimático ribonucleico que permite a manutenção do telômero em 90% dos casos de câncer. Nas células somáticas normais, a atividade da telomerase é baixa ou indetectável, e os telômeros se encurtam a cada divisão celular. A hTert é a transcriptase reversa da telomerase, sendo o mais importante fator na formação da telomerase funcional. A ativação da telomerase estabelece a manutenção do comprimento do telômero, atuando no processo de transformação das displasias em alterações neoplásicas malignas na manutenção de populações celulares fenotipicamente mais agressivas⁸. A hTert está presente em 28,5% das NIC I, 87,5% das NIC II e 95% das NIC III⁹.

Entre os tratamentos existentes para o manejo das neoplasias intraepiteliais cervicais, em nosso hospital realiza-se a técnica de conização e a de excisão eletrocirúrgica da zona de transformação (LEEP). A primeira técnica tem a vantagem de possibilitar a ressecção da lesão e avaliar as margens sem a presença de artefatos de fulguração pela passagem de corrente elétrica, mas é um procedimento que remove maior volume de estroma cervical, o que pode acarretar desfechos reprodutivos adversos. A técnica de LEEP é um procedimento tecnicamente mais simples, que pode ser feito em ambulatório sob anestesia local. Por outro lado, as margens podem ser inadequadas para avaliação devido aos artefatos histológicos causados pelo dano térmico, tem maior risco de sangramento e pode causar estenose cervical em até 6% das pacientes¹⁰. A literatura recomenda que as pacientes devam ser acompanhadas por no mínimo um ano, com exame citopatológico cervical (CP) e com colposcopia semestral após a cirurgia, por ser o período de maior risco de recorrência das lesões cervicais¹¹. A taxa de recorrência das lesões intraepiteliais de alto grau após excisão cirúrgica varia de 5% a 10%^{4,12,13}.

Tendo em vista as taxas de complicações associadas ao tratamento cirúrgico dessas lesões, tais como sangramento, estenose de orifício cervical externo, infertilidade, encurtamento de colo uterino e risco de trabalho de parto prematuro, incompetência istmo-cervical,

fetos com baixo peso, risco de parto cesáreo e ruptura prematura de membranas¹⁴, analisar se a associação entre recorrência após tratamento cirúrgico e a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos conforme a graduação das lesões intraepiteliais de alto e baixo grau permitiria a suspensão de um seguimento clínico rigoroso e reduziria o “overdiagnosis” e o “overtreatment” nas pacientes acometidas por esta doença. Até o momento, não há descrição da avaliação concomitante dos três marcadores imuno-histoquímicos - p16^{ink4a}, Ki67 e hTert nas lesões intraepiteliais de alto e baixo grau. Como já descrito, o único marcador que tem utilidade bem estabelecida na avaliação de progressão, e não de recorrência, dessas lesões é a p16^{ink4a}¹⁵. Os demais marcadores ainda são pouco estudados e, portanto, há poucos trabalhos publicados em relação ao Ki67 e à hTert, sem acurácia estabelecida para o emprego na prática clínica, embora pareçam mostrar diferença de acordo com a sua expressão entre as lesões de alto e baixo grau¹⁶. Além disso, o comportamento da NIC II ainda é incerto, e, até o momento, esta lesão é tratada da mesma forma que a NIC III, conduta uniformizada a partir do consenso de Bethesda, de 1991¹⁷. Entretanto, nos últimos anos, tem-se questionado a sua agressividade, pois se comporta de forma dúbia, com significativo número de casos com boa evolução, regressão espontânea ou comportamento indolente^{6,7}. Portanto, o estabelecimento de marcadores de risco de recorrência em relação a esse tipo de lesão é inovador e poderia definir quais as pacientes que necessitariam de tratamento cirúrgico e quais seriam passíveis de se manter em acompanhamento clínico. Essa resposta ainda não existe na literatura.

MÉTODOS

Estudo de coorte histórica em que foram analisadas 94 pacientes divididas em três grupos com lesões intraepiteliais cervicais, NIC I, NIC II e NIC III, submetidas à conização ou à LEEP. As pacientes foram seguidas por dois anos, a fim de determinar a recorrência da doença. A amostra foi composta por pacientes do ambulatório de Ginecologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), que realizaram exame citopatológico cervical seguido por colposcopia com biópsia de áreas suspeitas, e com diag-

nóstico subsequente de NIC, recrutadas por amostragem de conveniência (consecutiva). Todos os casos do estudo tiveram os exames histológicos revisados por um segundo patologista com experiência clínica superior a 20 anos.

Os critérios de inclusão foram pacientes com 18 anos de idade ou mais, submetidas à LEEP ou conização com seguimento pós-cirúrgico semestral (CP de colo uterino, colposcopia e biópsia de colo se necessário) por no mínimo dois anos, e com as respectivas peças cirúrgicas com margens livres de neoplasia intraepitelial cervical. Os critérios de exclusão foram pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou com outras desordens imunossupressivas e gestantes.

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. O método de detecção utilizado para pesquisa de antígenos em tecidos foi avidina-biotina peroxidase. Foram realizados cortes histológicos com 3µm de espessura em micrótomo rotativo Leica RT2150. As lâminas foram desparafinizadas em estufa histológica com temperatura de 69°C, duas incubações em xilol, cinco incubações com álcool etílico 99°, lavagem em água corrente até remoção completa e depois mantidas em tampão PBS. A recuperação antigênica utilizou tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 5% em álcool metílico. A incubação com o anticorpo primário foi realizada em incubadora BOD a 5°C. Para detecção da reação antígeno-anticorpo foi utilizado anticorpo secundário biotinilado e complexo avidina-HRP. A marcação foi realizada utilizando como cromógeno a Diamina Benzidina (DAB, DAKO). Por fim as lâminas foram contracoradas utilizando Hematoxilina de Harris, desidratadas em uma série de álcool etílico 99°, clarificadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá. Os clones utilizados para os marcadores foram E6H4 para p16^{ink4a}, MM1 para Ki67 e 2C4 para hTert. Para detecção de p16^{ink4a}, Ki67 e hTert foram utilizados, como controles negativos, lâminas sem neoplasia intraepitelial cervical e, como controles positivos, lâminas com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC III). Quanto à interpretação dos marcadores, a coloração nuclear foi considerada positiva para as células que expressaram p16^{ink4a}. A intensidade de expressão para p16^{ink4a} nas neoplasias intraepiteliais cervicais foi graduada como negativa se nenhuma das células expres-

sou coloração, e como positiva se expressaram coloração conforme percentual (menos de 10%, 11% a 50% ou mais de 50%). A Ki67 foi considerada positiva somente se o núcleo das células estava corado e determinou-se o percentual de células que a expressavam em menos de 10%, 11% a 50% ou mais de 50%. A hTert foi considerada positiva também se o núcleo das células estava corado. A expressão foi considerada positiva se as células expressavam coloração e negativa quando não havia expressão.

Os dados foram digitados no programa Excel 2010 e, posteriormente, exportados para o programa SPSS v.20.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis categóricas por frequências e percentuais e associadas pelo teste de Qui-quadrado. As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram descritas pela média e o desvio padrão, comparadas entre duas categorias pelo teste t de Student para amostras independentes e entre três categorias ou mais pelo teste de Análise de Variância (ANOVA). As variáveis quantitativas com distribuição assimétrica foram descritas pela mediana e o intervalo interquartil (percentis 25 e 75), comparadas entre duas categorias pelo teste de Mann-Whitney e entre três ou mais categorias pelo teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado um nível de significância de 5%.

O projeto foi aprovado pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde e pelo Comitê de Ética/PUCRS (CEP 109403/2014).

RESULTADOS

A média de idade das pacientes foi 38 anos, com desvio padrão de 11,7, 37% faziam uso de anticoncepcional oral combinado e 26% não utilizavam nenhum método anticoncepcional. Apenas 31% era tabagista, a média de filhos era de dois e a média da primeira relação sexual foi aos 16 anos de idade. A abordagem cirúrgica foi a conização em 79,8% das pacientes. Os resultados anatomopatológicos mais frequentes foram NIC III (52%), seguidos da NIC I (14,9%) e NIC II (12,8%). Entre as que recidivaram, a maior parte era portadora de NIC I, seguidas pelas portadoras de NIC III.

O número total de recorrências entre as 94 pacientes operadas, independente do tipo de procedimen-

Tabela 1. Tabela comparativa da graduação histológica em relação a expressão imuno-histoquímica dos marcadores.

	NIC I	NIC I/II* e II	NIC III	NIC II e III	P
p16^{ink4a}					0,026
≤10	3 (23,1)	5 (38,5)	8 (16,7)	-	
11-50	-	1 (7,7)	3 (6,2)	2 (16,7)	
>50	3 (23,1)	3 (23,1)	28 (58,3)	4 (33,3)	
Ausente	7 (53,8)	4 (30,8)	9 (18,8)	6 (50,0)	
Ki67					0,032
≤10	9 (64,3)	5 (38,5)	11 (22,4)	5 (41,7)	
11-50	3 (21,4)	1 (7,7)	9 (18,4)	-	
>50	2 (14,3)	7 (53,8)	27 (55,1)	5 (41,7)	
Ausente	-	-	2 (4,1)	2 (16,7)	
hTert					0,677
Positivo	7 (50,0)	7 (53,8)	30 (62,5)	5 (45,5)	
Negativo	7 (50,0)	6 (46,2)	18 (37,5)	6 (54,5)	

Dados apresentados pelo n(%) e comparados pelo teste de Qui-quadrado. Dados em negrito são dados cujo residuo ajustado teve valor absoluto maior que 1,96.

* Lesão intraepitelial cervical de alto grau associada à de baixo grau.

to, foi 23 (24,5%). A recorrência foi mais comum nas pacientes que realizaram LEEP (31%), enquanto naquelas submetidas à conização foi 22%. Houve uma associação estatisticamente significativa entre p16^{ink4a} e Ki67 e a graduação histológica, conforme mostra a tabela 1.

A expressão dos marcadores imuno-histoquímicos pode ser analisada nas figuras 1, 2 e 3.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre idade, fumo, paridade, idade da primeira relação sexual e número de parceiros sexuais e os diferentes graus histológicos, assim como, em relação à recorrência da doença. Quando se comparou os marcadores entre sujeitos com e sem recorrência, não houve, também, diferenças estatisticamente significativas.

DISCUSSÃO

O carcinoma do colo uterino tem alto potencial de prevenção. Entretanto, é um problema de saúde pública, visto que estudos demonstram incidência e mortalidade altas em países em desenvolvimento, mas doença bem controlada em países desenvolvidos cujos programas de rastreamento são efetivos¹⁸.

Estudos mostram que os marcadores imuno-histoquímicos p16^{ink4a} e Ki67 têm maior acurácia em

identificar lesões precursoras em pacientes com menos de 30 anos de idade com exame citopatológico cervical compatível com lesão intraepitelial de baixo grau. Constatou-se que a expressão destes marcadores está associada à gravidade das lesões histológicas. No estudo de Possati-Resende *et al.*¹⁸ pacientes realizaram biópsia de colo uterino, e a expressão de p16^{ink4a} e Ki67 estava presente em 46,5% dos NIC I, 82,8% dos NIC II e 92,8% dos NIC III. Em nosso trabalho, a p16^{ink4a} esteve superexpressa pelo método imuno-histoquímico em mais de 50% das células de cada amostra em 43,3% dos casos, apresen-

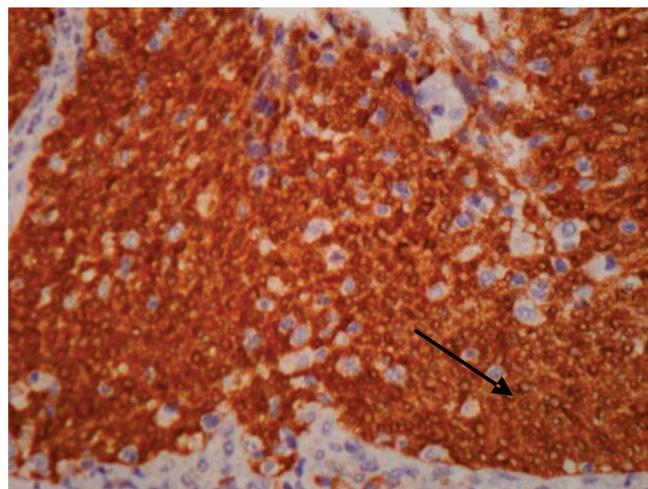


Figura 1. p16^{ink4a}. Aumento 200 vezes. Células nucleares com expressão do marcador em mais de 50% delas.

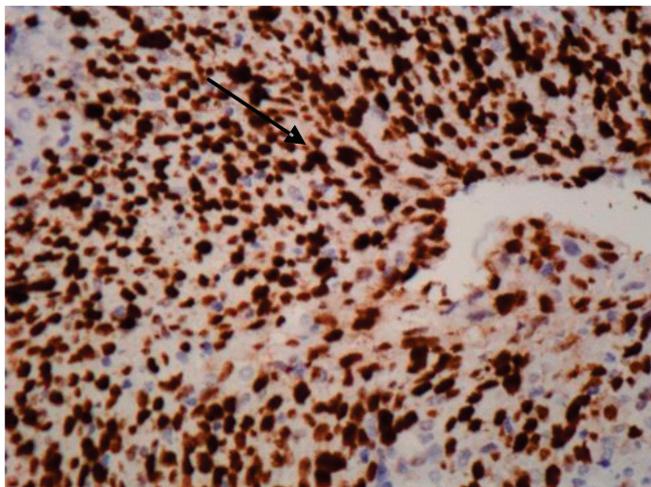


Figura 2. Ki67. Aumento 200 vezes. Células nucleares com expressão do marcador em mais de 50% delas.

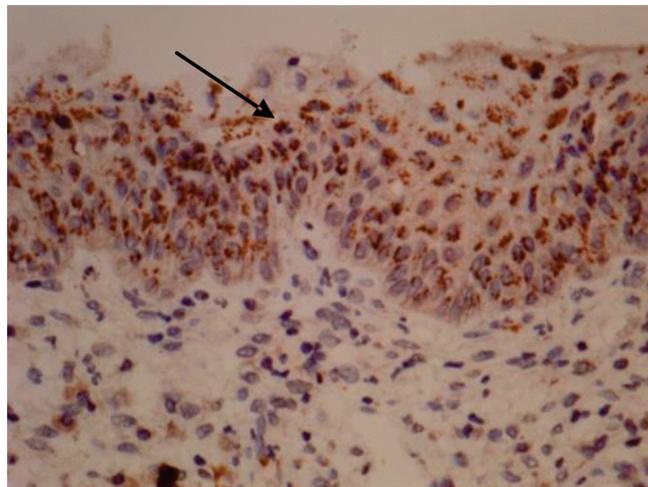


Figura 3. hTert. Aumento 200 vezes. Positividade nas células nucleares.

tando intensidade forte em 48,9% dos exames. O marcador Ki67% foi expresso em 43,6% dos casos (positiva em mais de 50% da amostra). Já a hTert foi positiva em 56,5% dos casos analisados.

Embora a incidência das neoplasias malignas de colo tenha reduzido, observa-se ainda muitos diagnósticos de câncer em lesões cervicais com alto potencial de regressão e, conseqüentemente, de tratamentos inadequados e excessivos. Nesse contexto, o uso de marcadores imuno-histoquímicos auxiliam o patologista na avaliação histológica destas lesões¹⁹. Conforme *guidelines* americanos, pacientes que apresentam suspeita de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau e p16^{ink4a} superexpressa se beneficiam do tratamento cirúrgico. A positividade para esse marcador está ligada ao início da transformação oncogênica para desenvolvimento do câncer e, utilizá-lo, permitiria detectar lesões pré-neoplásicas e reduzir tratamentos agressivos desnecessários¹⁹.

A importância de se estudar estes marcadores se deve à ampla variabilidade de interpretação entre observadores e à pobre reprodutibilidade dos critérios citomorfológicos, principalmente quanto à utilização de hematoxilina e eosina, para o diagnóstico histológico das neoplasias intraepiteliais cervicais, assim como, sua classificação nas categorias NIC I, II e III. Esta limitação foi minimizada, neste trabalho, através da avaliação e da concordância de diagnóstico por dois patologistas: o interpretador original do caso e o revisor. O uso destes marcadores complementa os diagnósticos duvidosos,

evitando tratamentos desnecessários^{20,21}. A presença do marcador Ki67 em NIC I e NIC II em histologias de colo uterino é um forte fator preditivo independente para graduação e progressão da doença, além de ter uma reprodutibilidade interobservador de 100%²². A literatura mostra que os marcadores imuno-histoquímicos avaliados, p16^{ink4a}, Ki67 e hTert, estão claramente associados à graduação histológica. Alguns trabalhos demonstram associação com o risco de progressão para neoplasias de alto grau e câncer, mas nenhum deles mostra que sua superexpressão esteja associada à recorrência após tratamento.

A taxa de recorrência da NIC normalmente varia entre 5% e 10%^{4,12,13}. Contudo, no estudo de Serati *et al.*²³, que acompanhou pacientes durante dez anos, a recorrência ocorreu em 19,4% das excisões com margens livres e foi duas vezes mais comum com a técnica de LEEP. Embora em nosso estudo tenham sido incluídas apenas peças cirúrgicas com margens livres, a incidência de recorrência de 24,5% foi elevada quando comparada às taxas descritas na literatura. Por outro lado, Malapati *et al.*²⁴ em acompanhamento de 717 pacientes elegíveis após LEEP, observaram persistência/recorrência no pós-operatório de 24,7%. O tipo de recorrência mais comum foi a NIC I (47,8%), seguida da NIC III (34,8%), e a maior parte ocorreu nos primeiros seis meses após o tratamento (56%).

Não houve diferença entre a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos analisados quanto à recorrência da doença, nem mesmo quando avaliados

individualmente em cada graduação histológica. Tal fato pode ser decorrente do número pequeno de casos e da subdivisão da positividade da expressão imuno-histoquímica dos marcadores avaliados em igual ou inferior a 10%, 11% a 50% e maior do que 50%, ao contrário de outros estudos em que a análise quantitativa foi feita em números absolutos, método que ainda apresenta limitações para implementação na rotina diagnóstica na patologia cirúrgica. O estudo de Cardoso *et al.*⁴ foi um dos poucos que mostrou significância estatística entre superexpressão de p16^{ink4a} e recorrência da doença, assim como, o de Nam *et al.*²⁵. Fonseca *et al.*²⁶ demonstraram que a p16^{ink4a} estava superexpressa em 43% das recorrências, com intensidade forte em 58% delas, entretanto, este achado não foi estatisticamente significativo. Num grupo de 90 pacientes com neoplasia intraepitelial cervical com p16^{ink4a} e Ki67 superexpressas, houve progressão em 15 casos (17%), dois casos no grupo de 25 pacientes com NIC I (8%) e 13 casos no grupo de 65 pacientes com NIC II (20%)²². A expressão de Ki67, no nosso estudo, mostrou-se positiva em 10% ou menos na NIC I e superexpressa em mais de 50% de cada amostra em 53% das NIC II e 55% das NIC III (p=0,032).

A idade, o tabagismo, o número de filhos, a idade da primeira relação sexual e o número de parceiro sexuais não mostraram diferença significativa quanto à recorrência da doença. Contrariando nossos achados, a literatura mostra que idade maior ou igual a 35 anos de idade e tabagismo são fatores de risco para recorrência, assim como, alterações citológicas maiores, infecção por HPV de alto risco no pré-operatório, margens endocervicais positivas e infecção por HIV^{24,27,28}.

A expressão da p16^{ink4a} em relação à graduação histológica foi estatisticamente significativa nesse trabalho, tendo sido negativa em 53% das NIC I, superexpressa em mais de 50% das NIC III em 58% dos casos e expressa em menor porcentagem (igual ou menos de 10% da amostra) em 38,5% dos casos das NIC II (p=0,026). Observou-se que as NIC II têm menor percentual de positividade para p16^{ink4a} que a NIC III, embora ambas superexpresssem tal marcador e com forte intensidade (53,8% das NIC II e 62,5% das NIC III). No estudo de Genovés⁶, que avaliou 92 pacientes, a p16^{ink4a} esteve superexpressa em sete de 54 pacientes com NIC I e em 17 de 23 pacien-

tes com NIC II. O trabalho ressalta que o diagnóstico de NIC II não deve ser baseado somente na positividade deste marcador, e que a ausência de sua expressão também não implica em regressão da lesão.

Em relação ao risco de progressão, um estudo que avaliou 52 pacientes com NIC II mostrou regressão da doença em 28 casos, progressão para NIC III em 13 e persistência da lesão em 11 casos. Naquelas que progrediram, 91% das lesões apresentavam p16^{ink4a} superexpresso com forte intensidade²⁹. Em relação a hTert, a literatura também descreve a sua superexpressão em lesões intraepiteliais de alto grau (p<0,001) em 88% a 90% das amostras, enquanto as lesões intraepiteliais de baixo grau têm baixa expressão em 94% dos casos³⁰. Pode-se inferir que a expressão deste marcador representa uma manifestação precoce do processo displásico, portanto está superexpressa em 45% das NIC I, 70% das NIC II e 80% das NIC III (p=0,024)³¹. Em nosso estudo, a hTert não mostrou significância estatística em relação à graduação histológica (p=0,677), embora se tenha mostrado positiva em 62,5% das NIC III, 53,8% das NIC II e 50% das NIC I. Embora a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos tenha sido positiva na NIC II e na NIC III, observou-se expressão variável, mostrando-se mais intensa e em maior porcentagem de células, na displasia de alto grau. Tal comportamento da NIC II evidencia que esta lesão tem, provavelmente, um comportamento de menor agressividade quando comparada à NIC III. Segundo Wilkinson *et al.*³², a taxa de regressão da NIC II é semelhante à da NIC I num seguimento de dois anos (17% x 12%), constando que há um risco de "overtreatment" principalmente em mulheres abaixo de 25 anos de idade portadoras dessas lesões, visto que o risco de desenvolvimento de câncer cervical em mulheres não tratadas com displasias de alto grau é inferior a 1,5%.

Embora seja comprovada na literatura a importância do uso de marcadores imuno-histoquímicos na progressão de neoplasias intraepiteliais cervicais, também evidenciado em nosso trabalho, não houve associação dos marcadores com a recorrência de lesões displásicas. Novos estudos são necessários, assim como, a prospecção de novos marcadores, a fim de estabelecer com melhor precisão as características destas lesões e permitir o manejo conservador naquelas que apresentam um comportamento mais indolente.

ABSTRACT

Objective: to study the association between the histological grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN I, CIN II and CIN III) and the immunohistochemical expression for p16^{ink4a}, hTert and Ki67, as well as to evaluate the relationship of these markers with the risk of recurrence after surgical treatment. **Methods:** we studied a historical cohort of 94 women with intraepithelial lesions CIN I (low grade), CIN II and CIN III (high grades) submitted to conization or electrosurgical excision of the transformation zone. We evaluated all surgical specimens for immunohistochemical expression of p16^{ink4a}, hTert and Ki67. **Results:** the mean age was 38.2 years; p16^{ink4a} was absent in most CIN I cases. In patients with CIN II or III (association of low and high-grade lesions), we observed p16^{ink4a} ≤10%. In patients with CIN III, we found a higher expression frequency of p16^{ink4a} >50%. In CIN I, the majority had Ki67 ≤10% and low frequency of Ki67 >50%. In the CIN III category, there were fewer patients with Ki67 ≤10%, and Ki67 was absent in most patients of CIN II and III groups. There was no association between hTert expression and histologic grade. There were no statistically significant differences between the expression of the markers in patients with and without recurrence. **Conclusion:** there was a statistically significant association of p16^{ink4a} and Ki67 with histological grade. The markers' expression, as for disease recurrence, was not statistically significant in the period evaluated.

Keywords: Cervical Intraepithelial Neoplasia. Telomerase. Immunohistochemistry. Recurrence.

REFERÊNCIAS

- Wise J. Pilot study will assess whether HPV test should replace smears to screen for cervical cancer. *BMJ*. 2012;344:e3744.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: INCA; 2011.
- zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*. 1976;36(2 Pt 2):794.
- Cardoso FA, Campaner AB, Silva MA. Prognostic value of p16(INK4a) as a marker of clinical evolution in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3) treated by cervical conization. *APMIS*. 2014;122(3):192-9.
- Yildiz IZ, Usubütün A, Firat P, Ayhan A, Küçükali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract*. 2007;203(6):445-9.
- Genovés J, Alameda F, Mancebo G, Solé JM, Bellosillo B, Lloveras B, et al. Human papillomavirus detection and p16INK4a expression in cervical lesions: a comparative study. *Hum Pathol*. 2014;45(4):826-33.
- Martin CM, O'Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(5):605-15.
- Hsu CG, Wang PH, Ko JL, Chen GD, Chang H, Yang SF, et al. Concurrent high expression of human telomerase reverse transcriptase and human nonmetastatic clone 23 in high-grade squamous intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer*. 2007;17(4):851-7.
- Saha B, Chaiwun B, Tsao-Wei DD, Groshen SL, Naritoku WY, Atkinson RD, et al. Telomerase and markers of cellular proliferation are associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions. *Int J Gynecol Pathol*. 2007;26(3):214-22.
- Lindeque BG. Management of cervical premalignant lesions. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2005;19(4):545-61.
- Massad LS. Preinvasive disease of the cervix. In: Di Saia PJ, Creasman WT, Mannel RS, McMeekin DS, Mutch DG, editors. *Clinical gynecologic oncology*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2012. p. 1-30.
- Sarian LO, Derchain SF, Andrade LA, Tambascia J, Morais SS, Syrjänen KJ. HPV DNA test and Pap smear in detection of residual and recurrent disease following loop electrosurgical excision procedure of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2004;94(1):181-6.
- Prato B, Ghelardi A, Gadducci A, Marchetti I, Di Cristofano C, Di Coscio G, et al. Correlation of recurrence rates and times with posttreatment human papillomavirus status in patients treated with loop electrosurgical excision procedure conization for cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Cancer*. 2008;18(1):90-4.
- Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions:

- systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2006;367(9509):489-98.
15. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol*. 2013;32(1):76-115. Erratum in: *Int J Gynecol Pathol*. 2013;32(4):432. *Int J Gynecol Pathol*. 2013;32(2):241.
 16. Fujii T, Saito M, Hasegawa T, Iwata T, Kuramoto H, Kubushiro K, et al. Performance of p16INK4a/Ki-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(1):134-42.
 17. Solomon D, Nayar R. Sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2005.
 18. Possati-Resende JC, Fregnani JH, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134445.
 19. Pacchiarotti A, Galeotti S, Bellardini P, Chini F, Collina G, Dalla Palma P, et al. Impact of p16(INK4a) immunohistochemistry staining on interobserver agreement on the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol*. 2014;141(3):367-73.
 20. Calil LN, Edelweiss MI, Meurer L, Igansi CN, Bozzetti MC. p16 INK4a and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. *Pathol Res Pract*. 2014;210(8):482-7.
 21. Walts AE, Bose S. p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol*. 2009;40(7):957-64.
 22. Kruse AJ, Baak JP, Janssen EA, Kjellevoid KH, Fiane B, Lovslett K, et al. Ki67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cell Oncol*. 2004;26(1-2):13-20.
 23. Serati M, Siesto G, Carollo S, Formenti G, Riva C, Cromi A, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization: a 10-year study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;165(1):86-90.
 24. Malapati R, Chaparala S, Cejtin HE. Factors influencing persistence or recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure. *J Low Genit Tract Dis*. 2011;15(3):177-9.
 25. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, et al. Expression of the p16 and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol*. 2008;19(3):162-8.
 26. Fonseca FV, Tomasich FD, Jung JE, Maestri CA, Carvalho NS. The role of P16ink4a and P53 immunostaining in predicting recurrence of HG-CIN after conization treatment. *Rev Col Bras Cir*. 2016;43(1):35-41.
 27. Fu Y, Chen C, Feng S, Cheng X, Wang X, Xie X, et al. Residual disease and risk factors in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia and positive margins after initial conization. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;11:851-6.
 28. de Mello Silva MV, Coutinho IC, de Andrade Heráclio S, Fittipaldi HM Jr, Katz L. Factors associated with the persistence/recurrence of CIN2/3 in women submitted to loop electrosurgical excision procedure in a teaching hospital in northeastern Brazil: a case-control study. *J Low Genit Tract Dis*. 2014;18(4):286-90.
 29. Omori M, Hashi A, Nakazawa K, Yuminamochi T, Yamane T, Hirata S, et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16INK4a immunoreexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(2):208-17.
 30. Wang PH, Chen GD, Chang H, Yang SF, Han CP, Lin LY, et al. High expression of human telomerase reverse transcriptase in high-grade intraepithelial neoplasia and carcinoma of uterine cervix and its correlation with human papillomavirus infection. *Reprod Sci*. 2007;14(4):338-48.

31. Bravaccini S, Sanchini MA, Amadori A, Medri L, Saragoni L, Calistri D, et al. Potential of telomerase expression and activity in cervical specimens as a diagnostic tool. *J Clin Pathol*. 2005;58(9):911-4.
32. Wilkinson TM, Sykes PH, Simcock B, Petrich S. Recurrence of high-grade cervical abnormalities following conservative management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(6):769.e1-7.

Recebido em: 11/08/2016

Aceito para publicação em: 26/09/2016

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

Endereço para correspondência:

Ana Paula Szezepaniak Goulart

E-mail: anapgoulart@hotmail.com / calpetry@ig.com.br