

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

ANA PAULA SZEZEPANIAK GOULART

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TELOMERASE (HTERT), KI-67 E P16INK4A
EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS DE BAIXO E ALTO GRAU**

Porto Alegre
2016

ANA PAULA SZEZEPANIAK GOULART

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TELOMERASE (HTERT), KI-67 E P16INK4A
EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS DE BAIXO E ALTO GRAU**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da
Saúde da Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul. Área de Concentração em
Clínica Médica.

Orientador: Dr. Vinicius Duval da Silva

Co-orientador: Dr. Manoel Afonso Guimarães Gonçalves

Porto Alegre

2016

Ficha Catalográfica

G694a Goulart, Ana Paula Szezepaniak

Avaliação da expressão de telomerase (hTert), Ki-67 e P16iNK4a em lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau / Ana Paula Szezepaniak
Goulart . – 2016.

70 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva.

Co-orientador: Prof. Dr. Manoel Afonso Guimarães Gonçalves.

1. neoplasia intraepitelial cervical. 2. recidiva. 3. imuno-histoquímica. I. da Silva, Vinicius Duval. II. Gonçalves, Manoel Afonso Guimarães. III. Título.

Dedico este trabalho ao meu filho Henrique.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por permitirem à concretização da minha formação profissional.

Ao meu marido, Jonas, pela paciência e pelo apoio.

Ao meu orientador, Dr. Vinicius, pela acessibilidade, apoio e ensinamentos ao longo da minha formação médica e principalmente para a realização desse trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr Manoel Afonso, pelos ensinamentos diários.

Ao técnico em imunoistoquímica, Thiago, pela disponibilidade na execução desse projeto.

À residente Daniele Sparremberger pelo auxílio na coleta de dados.

E agradeço a Deus, que está presente em minha vida todos os dias.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a associação entre graduação histológica e a expressão imunoistoquímica para P16iNK4a, hTert e ki67, a fim de estabelecer o comportamento dessas lesões quanto à recorrência durante o seguimento de dois anos.

Pacientes e Métodos: Estudo de coorte histórica incluindo 94 mulheres, em que foram analisados 3 grupos de pacientes com lesões intraepiteliais cervicais de baixo (NIC I) e alto grau, classificadas em NIC II e III, submetidas à conização, a fim de determinar a recorrência da doença conforme a expressão dos marcadores imunoistoquímicos P16iNK4a, Ki67 e hTert.

Resultados: A idade média das pacientes foi de 38,2 anos. Nas pacientes com NIC I, houve maior frequência de P16iNK4a ausente, nas pacientes NIC II ou I/II observou-se maior frequência com P16iNK4a $\leq 10\%$. Nas pacientes NIC III observou-se maior frequência de expressão de P16iNK4a ($>50\%$). Na categoria NIC I houve mais pacientes com Ki67 $\leq 10\%$ e menor frequência de Ki67 ($>50\%$). Na categoria NIC III houve menos pacientes na categoria Ki67 $\leq 10\%$ e no grupo NIC II e III houve mais pacientes com Ki67 ausente. Não houve associação entre a expressão do marcador imunoistoquímico hTert e graduação histológica. Quando comparadas as expressões dos marcadores entre sujeitos com e sem recorrência, não houve diferenças estatisticamente significativas.

Conclusão: Houve uma associação estatisticamente significativa entre P16iNK4a, P16iNK4aM e Ki67 e a graduação histológica, entretanto não houve diferença estatística na expressão desses marcadores em relação à recorrência da doença no período avaliado.

Descritores: neoplasia intraepitelial cervical, imuno-histoquímica, recidiva.

ABSTRACT

Objective: To evaluate association between histological grade of low (CIN I) and high-grade intraepithelial cervical lesions (CIN II and III) and the immunohistochemical expression of p16INK4a, hTert and ki67 in order to establish the behavior of these lesions and recurrence during follow-up of two years. **Patients and Methods:** a historical cohort study of 94 women to analyze 3 groups of patients with low (CIN I) and high-grade (CIN II and III) cervical intraepithelial lesions underwent to knife, to determine the recurrence of disease associated to expression of immunohistochemical markers p16INK4a, Ki67 and hTERT.

Results: Mean age of the patients was 38.2 years. Patients with CIN I, there was a lower p16INK4a expression, while in patients CIN II or I / II a higher frequency of p16INK4a $\leq 10\%$ was observed. In patients with CIN III there was a higher frequency of p16INK4a expression ($> 50\%$). There were more patients with Ki67 $\leq 10\%$ of the cell population and lower frequency of Ki67 expression ($> 50\%$) in CIN I. In CIN III there were fewer patients in the category Ki67 $\leq 10\%$ and CIN II and III group there were more patients with absent expression of Ki67. There wasn't association between hTert and histological grade. When comparing the markers between subjects with and without recurrence there was no statistically significant difference.

Conclusion: There was a statistically significant association between p16INK4a, P16iNK4aM and Ki67 and histological grade, however there was no statistical difference in the expression of these markers in relation to recurrence of disease during the study period.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia, recurrence, immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - NIC I.....	29
Figura 2 - NIC II.....	29
Figura 3 - NIC III.....	29
Figura 4 - Expressão de P16iNK4a.....	31
Figura 5 - Expressão de Ki67.....	31
Figura 6 - Expressão de hTert.....	31
Figura 7 - Gráfico comparativo do p16INK4a entre os grupos de NIC.....	31
Figura 8 - Gráfico comparativo do p16INK4aM entre os grupos de NIC.....	33
Figura 9 - Gráfico comparativo do Ki67 entre os grupos de NIC.....	34
Figura 10 - Gráfico comparativo do hTert entre os grupos de NIC.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - História natural da neoplasia intraepitelial cervical.....	13
Tabela 2 - Recorrência de LIEAG após conização / LEEP.....	18
Tabela 3 - Tabela descritiva das características das pacientes.....	27
Tabela 4 - Tabela descritiva das características clínicas.....	28
Tabela 5 - Tabela descritiva dos marcadores na amostra.....	30
Tabela 6 - Tabela comparativa da graduação histológica em relação à expressão imunoistoquímica dos marcadores.....	32
Tabela 7 - Tabela comparativa dos fatores de risco entre os graus histológicos das neoplasias intraepiteliais cervicais.....	35
Tabela 8 - Tabela comparativa dos fatores de risco entre os sujeitos com e sem recorrência.....	36
Tabela 9 - Tabela comparativa dos marcadores imunoistoquímicos entre os sujeitos com e sem recorrência.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AC Injetável - Anticoncepcional injetável

ACO - Anticoncepcional oral combinado

AP - Laudo anatomopatológico

ASC-US - Atipias de significado indeterminado

CP - Exame citopatológico do colo uterino

DIU - Dispositivo intra-uterino

HIV - Infecção pelo vírus da imunodeficiência humana

HPV - Papilomavirus humano

hTerc - subunidade da telomerase que interrompe a apoptose celular

hTert - transcriptase reversa da telomerase, mais importante fator na formação da telomerase funcional

INCA - Instituto Nacional do Câncer

Ki67 - Marcador celular de proliferação expresso em todos os estágios do ciclo celular, exceto na fase G0

LEEP - Excisão eletrocirúrgica da zona de transformação

LIEAG - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

LIEBG - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

LT - Ligadura tubária

MAC - Método anticoncepcional

NIC - Neoplasia intraepitelial cervical

PCR - Reação em cadeia de polimerase

P16iNK4a - Proteína supressora tumoral, está superexpressa nos casos de displasia

P16iNK4aM - Intensidade da expressão do marcador p16iNK4a

VPN - Valor preditivo negativo

VPP - Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. HIPÓTESES.....	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	22
4.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	22
5. PACIENTES E MÉTODOS.....	23
5.1. DESENHO DO ESTUDO.....	23
5.2. TAMANHO DA AMOSTRA.....	23
5.3. AMOSTRA.....	23
5.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	23
5.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	24
5.6. TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA.....	24
5.7. INTERPRETAÇÃO DA P16iNK4A, Ki67 E hTert.....	25
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5.9. ASPECTOS ÉTICOS.....	26
6. RESULTADOS.....	27
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
Anexo A - Protocolo de Coleta de Dados.....	52
Anexo B - Ofício CEP.....	53
Anexo C - Artigo Original.....	54
Anexo D - Comprovante de Submissão do Artigo.....	70

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres (90% dos casos em países em desenvolvimento), sabe-se que no Brasil corresponde a 9,3% das neoplasias ginecológicas. Mundialmente, são diagnosticados 500.000 novos casos por ano, sendo responsável por 250.000 mortes anuais (1). Cerca de 75 a 80% dos cânceres cervicais são de células escamosas, os casos remanescentes são mais frequentemente adenocarcinomas (2). Aproximadamente 54% dos casos de câncer cervical ocorrem nos países asiáticos e 80% das mortes relacionadas a ele ocorrem em países em desenvolvimento; estima-se o aumento para 90% em 2020 (3). Os dados epidemiológicos e experimentais têm ligado o câncer cervical a infecções por determinados genótipos do papilomavirus humano (HPV). Dos 120 tipos de HPV, sabe-se que pelo menos 40 deles infectam o epitélio genital; muitos deles são transitórios, mas o principal fator de risco para neoplasia intraepitelial cervical é a infecção cervical persistente por genótipos de alto risco (4).

O diagnóstico precoce permite o tratamento curativo, para tanto se faz necessário o rastreio com citopatologia cervical anualmente. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) recomenda que o rastreio seja feito a cada 3 anos após dois exames negativos consecutivos em pacientes com idade entre 25 e 64 anos, desde que as amostras sejam satisfatórias e representativas da junção escamo-colunar (5).

A neoplasia maligna de colo uterino é precedida por uma longa fase de lesão precursora. Essa fase comumente é assintomática, são as neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), e pode perdurar por um período de 10 a 20 anos. O HPV é o mais importante agente causal isolado na patogênese dessa doença (6). A infecção genital por esse vírus é a doença sexualmente transmissível mais comum no mundo (7). No ano de 1976 Zur Hausen demonstrou a relação entre a infecção pelo HPV e o surgimento de neoplasias do trato genital. Cerca de 35 subtipos de HPV infectam o trato genital, os tipos 16 e 18 estão presentes em 70% dos cânceres cervicais escamosos e 80% de todos os adenocarcinomas, enquanto os tipos 6 e 11 são responsáveis principalmente pelas verrugas genitais (2, 8). O risco de adquirir o vírus durante a vida é cerca de 80% (2), apesar da infecção ser mais frequente em

mulheres jovens sexualmente ativas, detecta-se uma prevalência relativamente alta em mulheres pós-menopáusicas (decorrente da reativação de infecções adquiridas anteriormente ou infecção adquirida de novos parceiros sexuais nessa fase da vida) (2, 9); estimando-se que 630 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo vírus (1). Entretanto, a infecção normalmente é transitória, com resolução espontânea em 70% dos casos no período de um ano (1). Aproximadamente 10% das mulheres com exames citopatológicos (CP) normais são portadoras de HPV, todavia naquelas que apresentam lesões em colo uterino esse número atinge 90 a 100% (10); o HPV é encontrado em 100% das amostras de pacientes com carcinoma cervical ou NIC III (11). A prevalência de HPV em exames citopatológicos normais pode variar de 1,6 a 41,9% conforme o país avaliado; entretanto, sabe-se que nessas pacientes, 70% das infecções causadas pelo vírus são decorrentes dos subtipos de alto risco (12). A infecção é mais comum em pacientes jovens, como já relatado, e na maioria dos casos é transitória (6 a 14 meses). Outros fatores de risco para infecção também incluem comportamento sexual, idade, fumo, paridade e uso de contraceptivos (1, 6). Num trabalho com adolescentes brasileiras entre 15 e 19 anos, publicado em 2013, encontrou-se 30 diferentes subtipos de HPV (24,8% alto risco, sendo mais frequente o HPV 16) e a prevalência de HPV nesse grupo foi de 28%. Nesse estudo, a alta prevalência em adolescentes associava-se ao número de parceiros sexuais; nessa população, a alteração no exame citopatológico correlacionava-se com a presença de um ou múltiplos tipos de HPV, mas a co-infecção por vários subtipos é que estava associada à progressão da doença (13).

Os dados da literatura mostram que as lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG) correspondem a 9,7% dos exames alterados; e 1 a 2% das biópsias realizadas diagnosticam carcinoma invasor. Além disso, 1% das NIC I, 5% das NIC II e 12% das NIC III progridem para câncer invasor (14). (Tabela 1)

Tabela 1: História natural da neoplasia intraepitelial (14, 15)

	% REGRESSÃO	% PERSISTÊNCIA	PROGRESSÃO PARA CIS	PROGRESSÃO PARA CA INVASOR
NIC I*	57%	32%	11%	1%
NIC II*	43%	35%	22%	5%
NIC III*	32%	56%	12%	12%

*Nomenclatura de 1968, Richart, R., pré-Bethesda 1991. NIC I: lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG); NIC II, III e CIS (Carcinoma in situ): alto grau (LIEAG).

Por outro lado, em relação à NIC II, estudos mostram que o seu comportamento é controverso, há registros de que um grande número dessas lesões regride espontaneamente (regressão em 55% dos casos num período de 4 a 6 anos) (6); e que a persistência dessa lesão após 3 anos de acompanhamento é de 40,8% naquelas pacientes com HPV 16, 17,5% com HPV 18 e 10% com outros HPVs de alto risco. Também se observa que as lesões por NIC II têm menor associação com os subtipos de HPV 16 e 18 com o avançar da idade (16, 17). Concomitantemente, a literatura descreve que o NIC II é o diagnóstico menos reproduzível, com uma taxa de concordância inter-observador de aproximadamente 50%, enquanto para NIC III é de cerca de 87% (18). Em relação às lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG), sabe-se que correspondem a 2,3% dos rastreios citopatológicos, algumas dessas lesões são causadas por genótipos de alto risco (5). O HPV 16 pode estar presente em 26,3% delas, enquanto os HPVs 6 e 11 em 12,1%. As LIEBG positivas para HPV 16 e 18 têm maior probabilidade de progressão para câncer de colo uterino (esses genótipos estão presentes em 35% das LIEBG e são responsáveis por 70% das neoplasias malignas de colo uterino) (19). No estudo de Zhou et al, com 808 pacientes, os genótipos de HPV de alto risco foram encontrados em 74% das amostras citológicas de LIEBG (20).

Apesar de estar bem estabelecido o principal agente causal associado às neoplasias intraepiteliais cervicais e ao câncer de colo uterino, o diagnóstico acurado dessas lesões precursoras do câncer cervical permanece um desafio, visto que é fator determinante de prognóstico e de sobrevida. É inquestionável a associação do HPV na gênese da maioria das lesões cervicais. 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 celulares (21). Observa-se que a infecção pelo HPV oncogênico não é suficiente para a imortalização da célula epitelial hospedeira. Alterações epigenéticas e genéticas que ocasionam o descontrole do ciclo celular são necessárias para a aquisição do fenótipo imortal, dentre elas ocorrem modificações covalentes do DNA e proteínas histonas que alteram a sequência e a metilação do

DNA (22). O uso de marcadores moleculares tem auxiliado a histopatologia na definição de casos duvidosos e para identificar mulheres de alto risco para recorrência (21, 23).

A P16iNK4a, uma proteína supressora tumoral, está superexpressa nos casos de displasia, apresentando alta sensibilidade por correlacionar-se com a severidade da displasia. Estudos atuais propõem que a P16iNK4a é um biomarcador útil para lesões de alto risco e para prever progressão nas lesões de baixo risco. Tais trabalhos mostram uma associação significativa entre grau da lesão cervical e distribuição e intensidade da expressão da P16iNK4a (presente em todas as LIEAG e em 80% das LIEBG - 26,6% com lesões de alto risco para progressão) (18, 23). Quando utilizado como método de triagem para ASC-US, apresenta alta especificidade e ausência de perda de sensibilidade em relação ao teste HPV. Na triagem das LIEBG, mostra-se menos sensível, entretanto mais específica do que o teste do HPV, então, em virtude disso, mulheres com LIEBG com P16iNK4a negativo não devem ser referenciadas ao protocolo habitual de rastreamento do câncer de colo uterino (24). A P16iNK4a também apresenta maior especificidade e valor preditivo negativo (VPN) que a reação em cadeia de polimerase (PCR) para o HPV, por traduzir a atividade viral potencialmente precursora de evolução para carcinoma (25). A positividade NIC II e III / P16iNK4a mostra uma sensibilidade de 83,5% e um valor preditivo positivo (VPP) de 80,1%, já a sua superexpressão mostra sensibilidade de 84%, especificidade de 98%, VPP de 83,5% e VPN de 86% na detecção de HPV de alto risco (18). Conforme Cardoso et al, que avaliou 76 mulheres com LIEAG - NIC III, a contagem no campo de P16iNK4a superior a 167 células / mm² (117,1 - 369,8) infere que são pacientes de alto risco para recorrência com necessidade de controle rigoroso. O risco de recidiva da doença nesse grupo foi de 30% (P < 0,001; risco de recorrência de 10%, de doença residual de 17% e de invasão de 3%) (21). Lambert et al demonstrou associação entre esse marcador e graduação histológica das lesões cervicais em uma população do nosso serviço (26). Todavia, em outro estudo com amostra também do nosso hospital, não houve correlação significativa entre superexpressão de P16iNK4a e prognóstico das lesões cervicais (27). As recomendações finais aprovadas em 2012 pelo Colégio de Patologistas Americanos e pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical para o uso de biomarcadores, para clarificar interpretações histológicas e

elucidar a acurácia diagnóstica, concluiu o uso do marcador acima para esse fim, visto que somente o P16iNK4a é reconhecido no contexto da biologia do HPV ao refletir a ativação da proliferação celular via E6 e E7 (28). Como já mencionado e, ao contrário de outras displasias, esse marcador está superexpresso nas pacientes infectadas pelo HPV. A presença de oncoproteínas E6 e E7 explica essa superexpressão, a proteína E7 inativa a proteína Rb, enquanto a E6 induz a degradação do gene supressor tumoral p53. A inativação do Rb libera esse marcador do controle de *feedback* negativo, causando aumento nos seus níveis e replicação celular descontrolada (29, 30).

O Ki67 é um outro marcador celular de proliferação expresso em todos os estágios do ciclo celular, exceto na fase G0, e que não está envolvido especificamente no processo carcinogênico cervical, contudo, tem um valor preditivo independente para graduar e avaliar progressão da doença. Sabe-se que a progressão para câncer é baixa nos casos em que está presente em menos de 30% do terço médio do epitélio (6). Conforme Queiroz et al, tal marcador e a P16iNK4a mostram maior associação com graduação histológica em relação a outros marcadores (p53 e ciclina D1), o primeiro com 84,7% de associação e o último com 77,4% (31). Quando se avalia a associação desses dois marcadores com exames citopatológicos com diagnóstico de Atipias de Significado Indeterminado (ASC-US) e LIEBG, mostraram alta acurácia no diagnóstico de LIEAG e maior especificidade comparadas à pesquisa de HPV de alto grau (32). Avaliando o Ki67, proteína expressa em células em diferentes etapas de proliferação, como método para avaliar progressão de NIC I e NIC II, estudou-se 90 pacientes: dessas, 17% progrediram para NIC III (8% do grupo NIC I e 20% do NIC II), nenhuma delas estava no grupo do Ki67 de baixo risco para progressão, enquanto 30% delas estavam (células positivas no mínimo em 1/3 do epitélio) (33).

A telomerase é um complexo enzimático ribonucleico que permite a manutenção do telômero em 90% dos casos de câncer. O telômero é a porção final do cromossomo humano composto por bandas repetidas da sequência TTAGGG (que tem papel importante na regulação da replicação celular). Portanto, a telomerase é uma DNA polimerase RNA dependente que catalisa a adição de sequências repetidas de telômeros na porção distal do cromossomo. Nas células

somáticas normais, a atividade da telomerase é baixa ou indetectável, e os telômeros se encurtam a cada divisão celular (34, 35). A hTerc é uma subunidade dela que interrompe a apoptose celular. A detecção dela distingue lesões de baixo e alto grau para progressão para câncer, com sensibilidade e especificidade superiores a 90% e também se correlaciona com a severidade da displasia. A hTerc foi encontrada em 21,1% das NIC I (57,8% delas com HPV de alto risco), 81,5% das NIC III e 100% dos carcinomas (78,5% deles com HPV de alto risco) (34). Já 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 e, conseqüentemente, a imortalidade celular no processo de progressão e, em várias neoplasias malignas, do comportamento de manutenção de populações celulares de diferentes imunofenótipos agressivos (35, 36). A hTert está presente em 28,5% das NIC I, 87,5% das NIC II e 95% das NIC III (36). Em outro estudo, a hTert mostrou sensibilidade de 81%, especificidade de 79% e acurácia de 80% no diagnóstico de neoplasias intraepiteliais cervicais (35). Portanto, o avanço da doença associa-se previsivelmente com o aumento da instabilidade genômica em pacientes infectadas (34). No estudo de Wisman, que avaliou 77 pacientes, a positividade para telomerase humana foi de 7% (50% eram hTert) nas NIC I, 54% (36% hTert) nas NIC II e 70% (61% hTert) nas NIC III (37).

Dentre os tratamentos existentes para o manejo das neoplasias intraepiteliais cervicais, nosso hospital realiza a técnica de conização e a de excisão eletrocirúrgica da zona de transformação (LEEP). A primeira técnica está indicada nos casos de colposcopia insatisfatória, lesões recidivantes, lesões com comprometimento glandular, suspeita de microinvasão, adenocarcinoma in situ ou atrofia cervical. As vantagens dessa técnica são a possibilidade de ressecção da lesão e avaliação de margens sem a presença de artefatos de fulguração pela passagem de corrente elétrica, contudo é um procedimento que remove maior volume de estroma cervical, o que poderia acarretar desfechos reprodutivos adversos. A técnica de LEEP pode ser feita naquelas lesões restritas ao colo ou naquelas com colposcopia satisfatória e com lesão que envolve no máximo 1 centímetro do canal endocervical. Esse procedimento é mais fácil, e 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 causar estenose cervical em até 6% das pacientes (5, 21, 38, 39).

A literatura recomenda que as pacientes devem ser seguidas por no mínimo um ano com CP e colposcopia semestralmente após o LEEP ou a conização, por ser o período de maior risco de recorrência das lesões cervicais (2, 40). A taxa de recorrência de LIEAG após excisão cirúrgica pode ser de 5 a 10%. (Tabela 2) Como já mencionado anteriormente, a recorrência e a persistência estão diretamente associadas ao subtipo de HPV presente na lesão. Além disso, a recorrência e a doença residual podem ser vistas naquelas pacientes submetidas à histerectomia com conização prévia mostrando excisão completa da lesão (doença residual em 20 a 35% dos casos). De acordo com Baloglu et al, os subtipos 16 e 18 foram identificados em 82,4% das lesões persistentes num grupo de 42 pacientes (41).

Tabela 2: Recorrência de LIEAG após conização / LEEP

	Recorrência
Debarge, 2003 (42)	2%
Sarian, 2004 (43)	10,2%
Lindeque, 2005 (39)	15%
Prato, 2008 (44)	9,4%
Cardoso, 2013 (21)	10,5%

Tendo em vista as taxas de complicações associadas ao tratamento cirúrgico dessas lesões (conizações), 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 membranas (45), analisar a associação entre recorrência após tratamento cirúrgico e a expressão dos marcadores imunoistoquímicos conforme a graduação das lesões intraepiteliais de alto e baixo grau permitiria a suspensão de um seguimento clínico rigoroso e reduziria sobrediagnóstico e sobretratamento nas pacientes acometidas por essa doença.

Até o momento, não há descrição da avaliação concomitante dos três marcadores imunoistoquímicos - P16iNK4a, Ki67 e hTert nas lesões intraepiteliais de alto e baixo grau; a literatura descreve estudos que avaliam isoladamente cada

marcador, mais frequentemente para lesões de alto grau, entretanto com escasso material acerca da subdivisão dessas lesões em NIC II e III, afim de que se pudesse avaliar o seu comportamento e risco de recorrência. Como já descrito, o único marcador que tem utilidade bem estabelecida na avaliação de progressão, e não de recorrência, dessas lesões é a P16iNK4a (28), os demais marcadores ainda são pouco estudados e, portanto, há poucos trabalhos publicados em relação ao Ki67 e à hTert, não apresentando acurácia estabelecida para o emprego na prática clínica, embora pareçam mostrar diferença conforme a sua expressão entre as lesões de alto e baixo grau (32, 33, 46, 47). Além disso, a literatura médica mostra estudos com populações de tamanho amostral pequeno, que se mostram estatisticamente significativos quanto a essas discrepâncias, permitindo o reconhecimento do perfil de agressividade das lesões cervicais através de métodos não invasivos (21, 31). O comportamento da NIC II ainda é incerto, e até o momento essa lesão é tratada da mesma forma que a NIC III, conduta uniformizada a partir do consenso de Bethesda de 1991, entretanto, nos últimos anos têm-se questionado a sua agressividade, pois comporta-se de forma dúbia, com significativo número de casos com boa evolução, regressão espontânea ou comportamento indolente (6, 18). Portanto, o estabelecimento de marcadores de risco de recorrência em relação a esse tipo de lesão é inovador, a fim de que se possa definir quais delas necessitam tratamento cirúrgico e quais sejam passíveis de se manter em seguimento. Essa resposta ainda não existe na literatura.

2. JUSTIFICATIVA

Em virtude do diagnóstico frequente de lesões intraepiteliais de alto grau na população jovem, o estudo visa a avaliação do comportamento das neoplasias intraepiteliais de baixo e alto graus quanto à sua subdivisão em NIC I, NIC II e NIC III. A avaliação do grau histológico associado ao estudo imunoistoquímico poderia demonstrar que a NIC II apresenta um comportamento de menor agressividade em relação à NIC III no seguimento após tratamento cirúrgico.

3. HIPÓTESES

1. As pacientes com maior risco de doença residual e recorrência, independente da graduação da NIC, apresentam perfil imunoistoquímico com maior expressão para P16iNK4a, Ki67 e hTert.
2. No grupo de pacientes com LIEAG, aquelas com NIC III diferem no seu perfil imunoistoquímico em comparação às com NIC II.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO PRINCIPAL:

- Avaliar a associação entre GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA e a expressão imunoistoquímica para P16iNK4a, hTert e Ki67, a fim de estabelecer o comportamento dessas lesões quanto à recorrência durante o seguimento de dois anos.

4.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

- Avaliar o perfil epidemiológico das pacientes portadoras de lesões intraepiteliais cervicais assistidas no ambulatório de Oncologia Ginecológica do Hospital São Lucas da PUCRS.
- Avaliar o perfil imunoistoquímico dos marcadores P16iNK4a; Ki67, hTert nessas pacientes por método semi-quantitativo da área de reação imunoistoquímica.
- Relacionar a graduação histopatológica com perfil imunoistoquímico.

5. PACIENTES E MÉTODOS

5.1. DESENHO DO ESTUDO

Este foi um estudo de coorte histórica, em que foram analisados 3 grupos de pacientes com lesões intraepiteliais cervicais de baixo (NIC I) e alto grau (NIC II e III) submetidas à conização ou à cirurgia de alta frequência. As pacientes foram seguidas por dois anos, a fim de determinar a recorrência da doença.

5.2. TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi calculado a partir de alfa 0,05 e beta de 0,9, com magnitude de efeito 0,8. Participaram do estudo 94 pacientes.

5.3. AMOSTRA

Pacientes do ambulatório de ginecologia do hospital São Lucas da PUCRS submetidas à conização ou à cirurgia de alta frequência por lesões intraepiteliais de alto e baixo graus (pacientes com exame citopatológico cervical seguido por colposcopia com biópsia das áreas suspeitas, com diagnóstico subsequente de LIEBG e LIEAG) recrutadas por amostragem de conveniência (consecutiva). Todos os casos do estudo foram revisados por um segundo patologista com experiência diagnóstica superior a vinte anos. Foi preenchido um protocolo de coleta de dados que consta de dados de anamnese e de diagnóstico anatomopatológico. (Anexo A).

5.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes a partir de 18 anos submetidas a LEEP ou conização com seguimento pós-cirúrgico semestral (CP de colo uterino, colposcopia e biópsia de colo se necessário) por no mínimo dois anos no ambulatório de ginecologia do Hospital São Lucas da PUCRS, e respectivas peças cirúrgicas com margens livres de neoplasia intraepitelial cervical.

5.5. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes menores de 18 anos, pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou com outras desordens imunossupressivas ou doenças que necessitassem de imunossupressores (transplantes, doenças imunológicas) e gestantes.

5.6. TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

A técnica de imunoistoquímica 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 desparinifizadas em estufa histológica por 20 minutos com temperatura de 69°C, 2 incubações em xilol por 5 minutos cada, 5 incubações com álcool etílico 99° por 2 minutos cada, lavagem em água corrente até remoção completa e depois mantidas em tampão PBS. A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos em microondas. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de Hidrogênio a 5% em álcool metílico com 2 incubações de 15 minutos cada e o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizada com leite em pó desnatado 10% em tampão PBS. A incubação com o anticorpo primário foi realizada em incubadora BOD a 5°C por pelo menos 8 horas. 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 contra coradas 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 P16iNK4a, MM1 para Ki67 e 2C4 para hTert.

Para detecção de P16iNK4a, Ki67 e hTert foram utilizados como controles negativos, lâminas sem neoplasia intraepitelial cervical; e foram utilizados como controles positivos lâminas com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC III).

5.7. INTERPRETAÇÃO DA P16iNK4A, Ki67 e hTert

A coloração nuclear foi considerada positiva para as células que expressaram P16iNK4a. A intensidade de expressão para P16iNK4a nas neoplasias intraepiteliais cervicais foi graduada como negativa se nenhuma das células expressaram coloração, positivo se expressaram coloração conforme percentual (menos de 10%, 11 a 50% ou mais de 50%). Também a P16iNK4a foi graduada conforme a intensidade da coloração em fraca, moderada e forte (31).

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.

5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram digitados os dados 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. A análise de resíduos ajustados foi utilizada para detectar frequências observadas maiores que as esperadas. 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%.

5.9. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde e pelo Comitê de Ética/PUCRS, CAAE 39276114.6.0000.5336 (Anexo B).

A pesquisa ofereceu mínimo risco ou dano à vida das pacientes, tendo em vista que se tratou de um estudo observacional.

6. RESULTADOS

Tabela 3: Tabela descritiva das características das pacientes

	n avaliado	Medidas descritivas
Idade, média±desvio padrão	93	38,2±11,7
Método Anticoncepcional (MAC), n(%)	91	
LT		15 (16,5)
ACO		34 (37,4)
Vasectomia		-
Condom		8 (8,8)
Ac.injetável		3 (3,3)
Nenhum		24 (26,4)
DIU		6 (6,6)
Condom+ACO		-
Implante intradérmico		1 (1,1)
Fumo, n(%)	86	
Sim		27 (31,4)
Não		46 (53,5)
Ex-tabagista		13 (15,1)
Número de filhos, mediana (intervalo interquartil)	93	2 (1-3)
Idade da primeira relação sexual, média±desvio padrão	77	16,7±3,9
Número de parceiros sexuais, mediana (intervalo interquartil)	26	4 (3-5)

Trata-se de um estudo com 94 pacientes cuja média de idade foi de 38,2 anos e desvio padrão de 11,7.

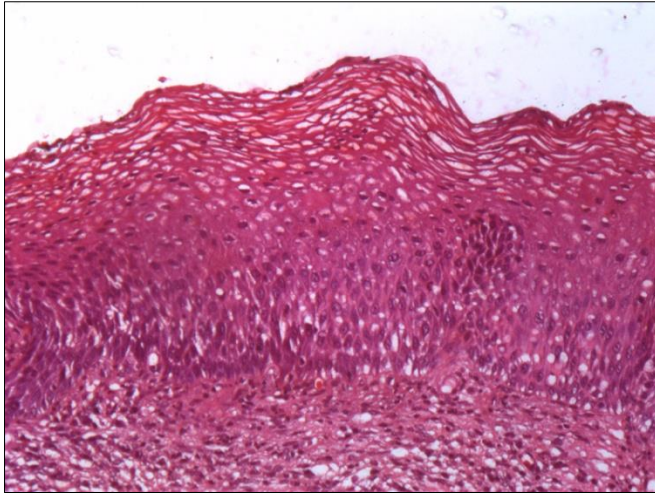
Na tabela 3 apresentamos as características das pacientes. A maior parte das pacientes utilizava anticoncepcional oral combinado como MAC e não fumava.

Tabela 4: Tabela descritiva das características clínicas

	N	n(%)
Cirurgia, n(%)	94	
Cone		75 (79,8)
LEEP		19 (20,2)
AP, n(%)	94	
Normal		2 (2,1)
Cervicite crônica		4 (4,3)
NIC I		14 (14,9)
NIC II		12 (12,8)
NIC III		49 (52,1)
NIC II e III		12 (12,8)
NIC I e II		1 (1,1)
Recorrência, n(%)		23 (24,5)
Recorrência tipo, n(%)	23	
NIC I		11 (47,8)
NIC II		3 (13,0)
NIC III		8 (34,8)
CP NIC I		1 (4,3)

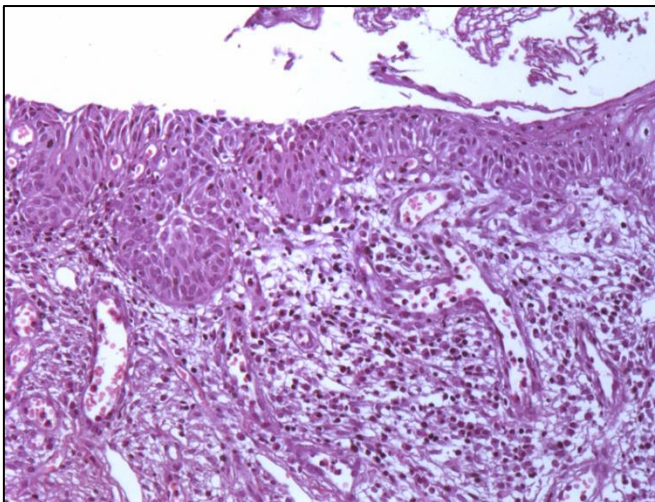
A tabela 4 mostra que as pacientes fizeram na sua maioria cone, pertenciam ao grupo NIC III e, dentre as recorrências, a mais frequente foi a NIC I seguida da NIC III. A recorrência foi mais comum nas pacientes que realizaram LEEP (31%) enquanto naquelas submetidas à conização foi de 22%.

Figura 1: NIC I



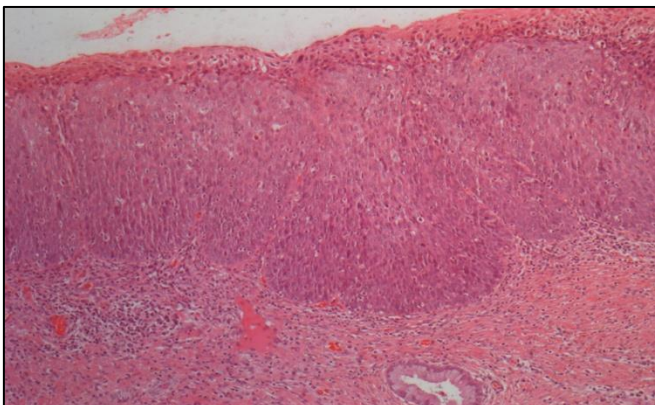
NIC I, hematoxilina, 200 X

Figura 2: NIC II



NIC II, hematoxilina, 200X

Figura 3: NIC III



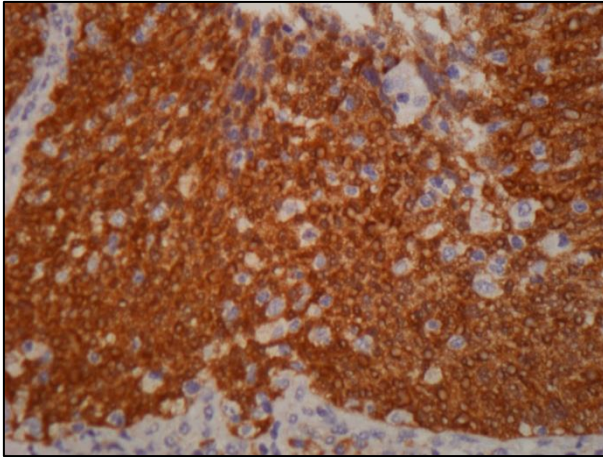
NIC III, hematoxilina, 100X

Tabela 5: Tabela descritiva dos marcadores na amostra

	n	n(%)
P16iNK4a	94	
≤10		17 (18,9)
11 a 50		6 (6,7)
>50		39 (43,3)
Ausente		28 (31,1)
P16iNK4aM	94	
Fraca		8 (8,9)
Moderada		10 (11,1)
Forte		44 (48,9)
Ausente		28 (31,1)
Ki67	94	
≤10		36 (38,3)
11 a 50		13 (13,8)
>50		41 (43,6)
Ausente		4 (4,3)
HTert	92	
Positivo		52 (56,5)
Negativo		40 (43,5)

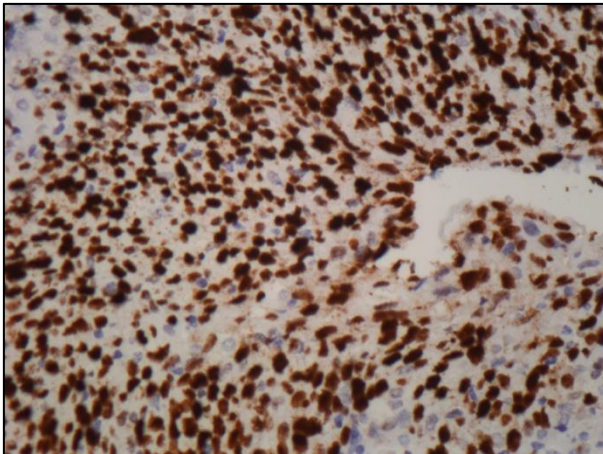
Na tabela 5 são apresentadas as frequências dos marcadores na nossa amostra.

Figura 4: Expressão de P16iNK4a



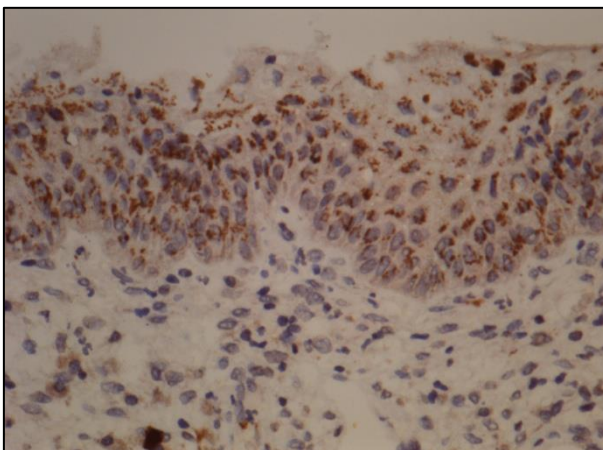
P16iNK4a superexpressa em mais de 50% das células nucleares do epitélio cervical. Aumento de 200 vezes.

Figura 5: Expressão de Ki67



Ki67 superexpressa em mais de 50% das células nucleares do epitélio cervical. Aumento de 200 vezes.

Figura 6: Expressão de hTert



hTerc positiva no epitélio cervical. Aumento de 200 vezes.

imunoistoquímica dos marcadores

	NIC I	NIC I/II e II	NIC III	NIC II e III	P
P16iNK4a					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)	
P16iNK4aM					0,034
Fraca	2 (15,4)	2 (15,4)	4 (8,3)	-	
Moderada	2 (15,4)	-	5 (10,4)	3 (25,0)	
Forte	2 (15,4)	7 (53,8)	30 (62,5)	3 (25,0)	
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 resíduo ajustado teve valor absoluto maior que 1,96.

Na tabela 6 apresentamos a associação entre a graduação histológica e a expressão imunoistoquímica dos marcadores. Houve uma associação estatisticamente significativa entre P16iNK4a, P16iNK4aM e Ki67 e a graduação histológica. Na análise de resíduos ajustados observamos que nas pacientes com NIC I, houve maior frequência de P16iNK4a ausente, nas pacientes NIC II ou I/II observamos maior frequência com P16iNK4a ≤10%. Nas pacientes NIC III observamos maior frequência de expressão de P16iNK4a (>50%) e menor frequência com expressão de P16iNK4a ausente. Nas pacientes com NIC I observamos maior frequência de pacientes com P16iNK4aM ausente e menor com P16iNK4aM com expressão forte, e no NIC III observamos maior frequência de P16iNK4aM forte e menor com ausência de expressão imunoistoquímica. Na

categoria NIC I houve mais pacientes com Ki67 $\leq 10\%$ e menor frequência de Ki67 ($>50\%$). Na categoria NIC III houve menos pacientes na categoria Ki67 $\leq 10\%$ e no grupo NIC II e III houve mais pacientes com Ki67 ausente. Nas figuras abaixo apresentamos estes resultados.

Figura 7: Figura comparativa do P16iNK4a entre os grupos de NIC

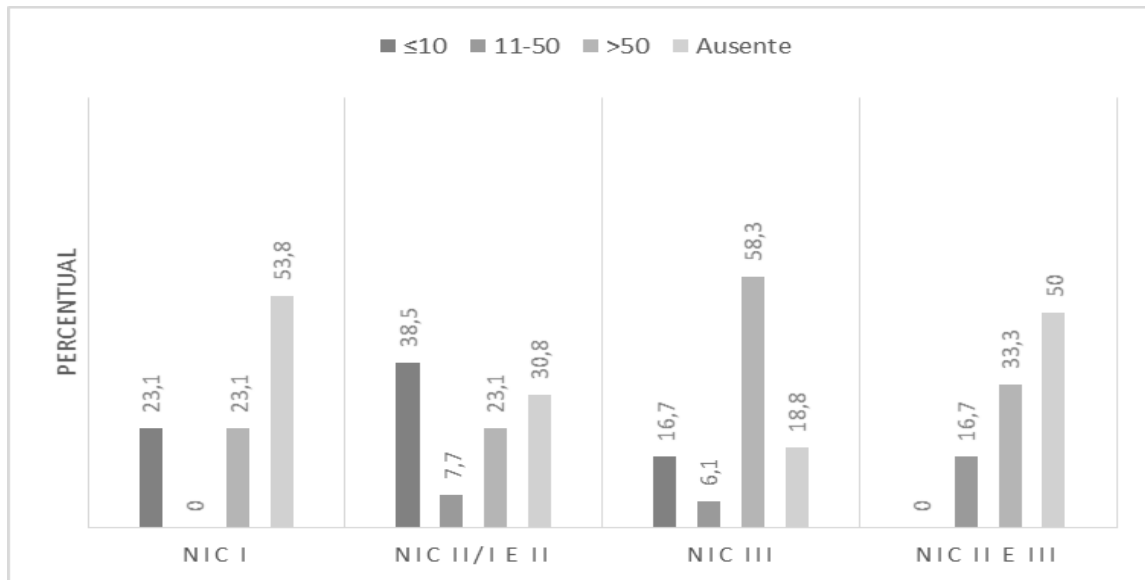


Figura 8: Figura comparativa do P16iNK4aM entre os grupos de NIC

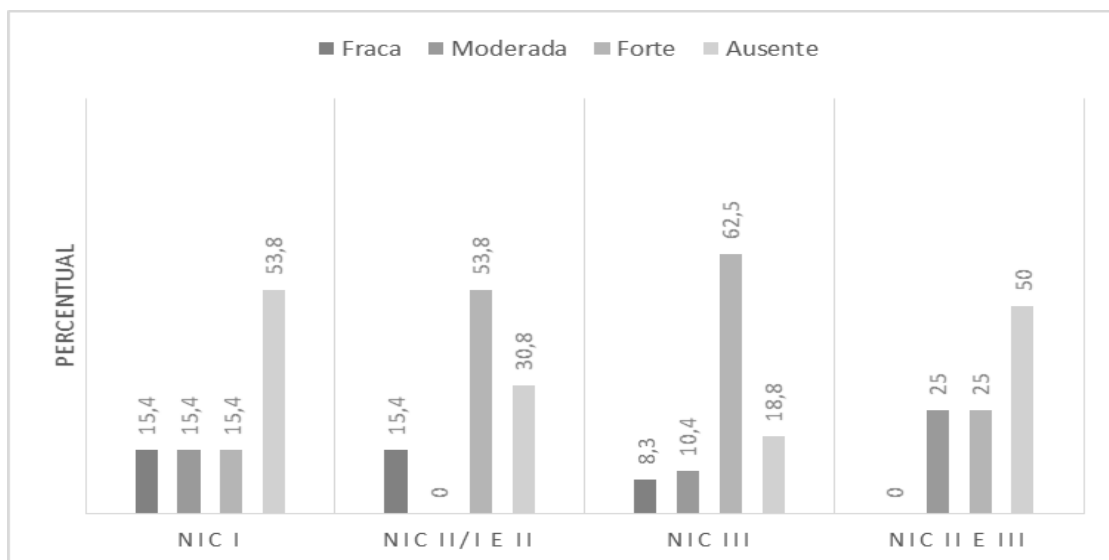


Figura 9: Figura comparativa do Ki67 entre os grupos de NIC

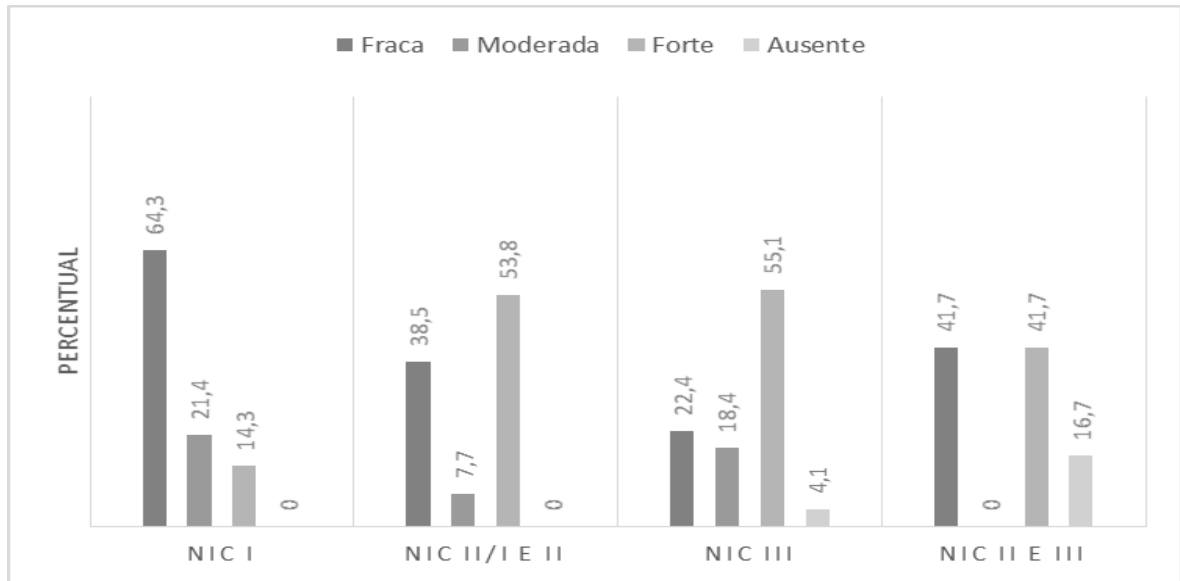


Figura 10: Figura comparativa do hTert entre os grupos de NIC

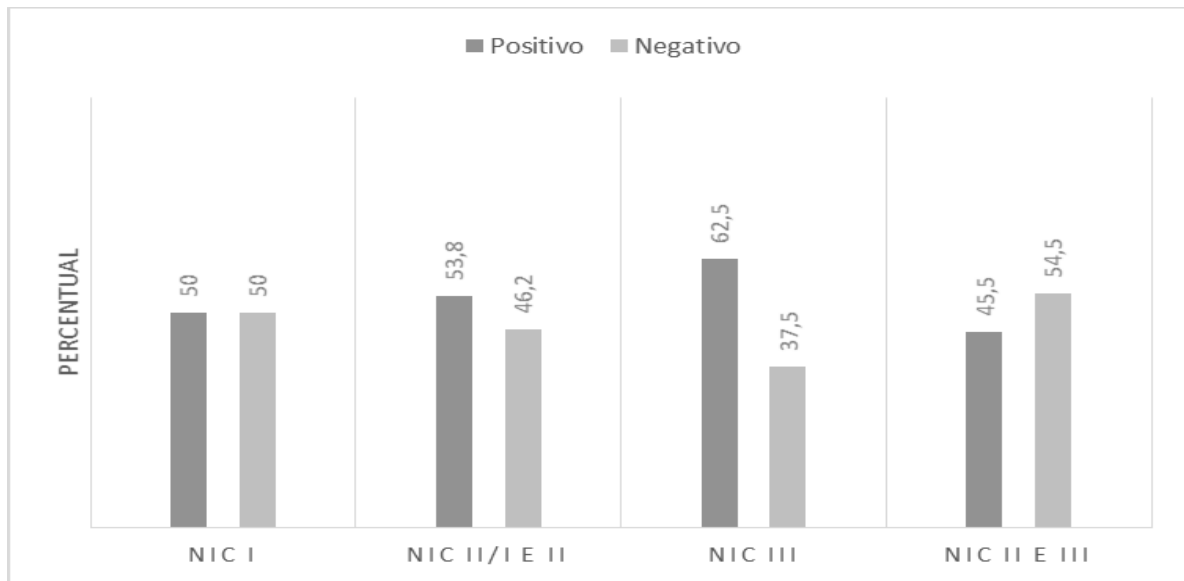


Tabela 7: Tabela comparativa dos fatores de risco entre os graus histológicos das neoplasias intraepiteliais cervicais

		NIC I	NIC II/ e II	NIC III	NIC II e III	P
Idade, média±desvio padrão		30,8±11,9	39,9±13,9	39,2±11,9	40,1±7,6	0,097*
Fumo, n(%)						0,398**
	Sim	2 (15,4)	4 (30,8)	18 (40,9)	2 (16,7)	
	Não	10 (76,9)	7 (53,8)	19 (43,2)	8 (66,7)	
	Ex-tabagista	1 (7,7)	2 (15,4)	7 (15,9)	2 (16,7)	
Número de filhos, mediana (intervalo interquartil)		1 (0-3)	2 (1-3)	2 (1-3)	3 (1-4)	0,244***
Idade da primeira relação sexual, média±desvio padrão		16,9±2,9	15,9±1,8	16,4±3,1	19,4±7,3	0,131*
Número de parceiros sexuais, mediana (intervalo interquartil)		3 (1-7)	5 (3-5)	4 (3-5)	3 (1-4)	0,422***

* Teste de Análise de Variância (ANOVA), ** teste de Qui-quadrado, ***Teste de Kruskal-Wallis

A tabela 7 comparou os fatores de risco entre os diferentes graus histológicos, não encontrando nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 8: Comparação dos fatores de risco entre os sujeitos com e sem recorrência

	Recorrência		P
	Sim	Não	
Idade, média±desvio padrão	38,7±7,1	38,0±11,4	0,807*
Fumo, n(%)			0,397**
Sim	5 (22,7)	22 (34,4)	
Não	12 (54,5)	34 (53,1)	
Ex-tabagista	5 (22,7)	8 (12,5)	
Número de filhos, mediana (intervalo interquartil)	3 (1-4)	2 (1-3)	0,166***
Idade da primeira relação sexual, média±desvio padrão	17,4±3,7	16,5±4,0	0,407*
Número de parceiros sexuais, mediana (intervalo interquartil)	2 (1-4)	4 (3-5)	0,063***

* Teste t de Student para amostras independentes, ** teste de Qui-quadrado, ***Teste de Mann-Whitney

Na tabela 8 comparamos os fatores de risco entre os sujeitos com e sem recorrência, não encontrando nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 9: Tabela comparativa dos marcadores imunoistoquímicos entre os sujeitos

com e sem recorrência

		Recorrência		P
		Sim	Não	
P16iNK4a				0,978
	≤10	4 (19,0)	13 (18,8)	
	11-50	1 (4,8)	5 (7,2)	
	>50	9 (42,9)	30 (43,5)	
	Ausente	7 (33,3)	21 (30,4)	
P16iNK4aM				0,917
	Fraca	2 (9,5)	6 (8,7)	
	Moderada	3 (14,3)	7 (10,1)	
	Forte	9 (42,9)	35 (50,7)	
	Ausente	7 (33,3)	21 (30,4)	
Ki67				
	≤10	11 (47,8)	25 (35,2)	
	11-50	1 (4,3)	12 (16,9)	
	>50	9 (39,1)	32 (45,1)	
	Ausente	2 (8,7)	2 (2,8)	
HTert				0,999
	Positivo	12 (54,5)	40 (57,1)	
	Negativo	10 (45,5)	30 (42,9)	

Dados apresentados pelo n(%) e comparados pelo teste de Qui-quadrado.

Quando comparamos os marcadores entre sujeitos com e sem recorrência não obtivemos diferenças estatisticamente significativas, como se pode verificar na tabela 9.

7. DISCUSSÃO

A neoplasia maligna de colo uterino é, dentre todos os carcinomas, a de maior potencial de prevenção, entretanto torna-se um problema de saúde pública, em virtude de que estudos mostram incidência e mortalidade altas em países em desenvolvimento, enquanto é uma doença bem controlada em países desenvolvidos que têm programas efetivos de rastreamento (48, 49). De acordo com Jiang et al, diagnostica-se mais de um milhão de casos de NIC I e cerca de quinhentos mil casos de NIC II e III ao ano (50). Embora a coleta do citopatológico do colo uterino reduza a incidência do câncer cervical, nota-se que tal método apresenta limitações, tais como sensibilidade variável de 47 a 62% e especificidade de 60 a 95% para detecção de NIC II e NIC III, além de uma variação de 5 a 20% de falsos negativos. Naquelas pacientes com CP apresentando ASC-US e LIEBG, a frequência de NIC II varia de 5 a 22% e 9 a 30% respectivamente. Estudos mostram que os marcadores imunoistoquímicos P16iNK4a e Ki67 têm maior acurácia em identificar lesões precursoras em pacientes com menos de 30 anos e CP mostrando LIEBG. Constatou-se que a expressão desses marcadores está associada a severidade das lesões histológicas. No estudo de Possati-Resende et al, 18 pacientes realizaram biópsia de colo uterino, e a expressão de P16iNK4a e Ki67 estava presente em 46,5% dos NIC I, 82,8% dos NIC II e 92,8% dos NIC III (48). Em nosso trabalho, que realizou o seguimento de 94 pacientes tratadas cirurgicamente com seguimento pós-operatório de dois anos, a P16iNK4a esteve superexpressa pelo método imunoistoquímico em mais de 50% das células de cada amostra em 43,3% dos casos, apresentando 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 tem-se reduzido, observa-se diagnósticos e tratamentos excessivos de lesões cervicais com alto potencial de regressão. Nesse contexto, o uso de marcadores imunoistoquímicos ligados à superexpressão de E6 e E7 na histologia auxiliam na avaliação dessas lesões (49). Conforme *guidelines* americanos, pacientes que apresentam neoplasia intraepitelial cervical suspeita de alto grau e p16INK4a superexpressa, beneficiariam-se de tratamento cirúrgico. A positividade para esse marcador está ligada ao início da transformação oncogênica para desenvolvimento do câncer;

utilizá-la detectaria lesões pré-neoplásicas e reduziria tratamentos desnecessários (49, 51, 52).

Conforme estudo de Calil et al, a P16iNK4a está expressa em 100% das lesões intraepiteliais de alto grau, assim como a Ki67 tem uma expressão associada à graduação histológica. A importância da avaliação desses marcadores deve-se ao fato da ampla variabilidade inter e intra-observador e pobre reprodutibilidade dos critérios citomorfológicos utilizando hematoxilina e eosina para o diagnóstico das neoplasias intraepiteliais cervicais, limitação que este trabalho procurou minimizar pela concordância de diagnóstico entre dois patologistas: o interpretador original do caso e o revisor. A positividade para P16iNK4a infere a necessidade de colposcopia, pois é um marcador para NIC II e lesões mais agressivas. O uso desses marcadores complementa os diagnósticos duvidosos, evitando tratamentos desnecessários (53, 54). A análise 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%. Entretanto, é apenas um marcador de proliferação celular e não tem papel direto na carcinogênese do colo uterino, traduzindo somente a taxa de proliferação celular (33, 55, 56).

A literatura mostra que os marcadores imunoistoquímicos avaliados (P6iNK4a, Ki67, hTert) estão claramente associados à graduação histológica, alguns 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 recorrência está comprovadamente associada a margens comprometidas pela doença após cone ou LEEP (49, 57), assim como ao tratamento inadequado da NIC, a reinfecção por HPV de alto risco e a persistência de infecções latentes por HPV (58). Idealmente, a conização deve remover completamente a lesão, mantendo a anatomia do colo, a fim de minimizar o risco de desfechos obstétricos adversos. A taxa de recorrência da NIC normalmente varia entre 5 a 10%, conforme já citado anteriormente (21, 43, 44). Contudo, no estudo de Serati et al, que seguiu pacientes durante dez anos, a recorrência ocorreu em 19,4% das excisões com margens livres, e foi duas vezes mais comum após o LEEP (57). Outro trabalho constatou que não houve diferença nas taxas de doença residual e recorrente associada ao tipo de procedimento com remoção incompleta da lesão cervical (22% LEEP X 27% conização), metanálise com 5137 casos. Além disso,

concluiu que a taxa de recorrência de doença de alto grau quando removida completamente é de 3% comparada à 18% quando permanece lesão no colo uterino (50). Na metanálise de Rositch et al, a idade média entre 30 e 34 anos, assim como a incidência de HPV de alto risco estiveram associadas à recorrência (58). Muitos autores corroboram que o envolvimento de margem após tratamento cirúrgico é um dos mais fortes preditores para doença residual e recorrente (59). Embora tenha sido incluído apenas peças cirúrgicas com margens livres na população do estudo realizado no HSL, a incidência de recorrência foi de 24,5%, que é elevada comparada às taxas descritas na literatura. Contudo, Malapati et al seguiu 717 pacientes elegíveis após LEEP e a persistência / recorrência no pós-operatório foi de 24,7% (60). O tipo de recorrência mais comum foi a NIC I (47,8%), seguida da NIC III (34,8%), a maior parte das recorrências ocorreram nos primeiros 6 meses após o tratamento (56% delas). Não houve diferença entre a expressão dos marcadores imunoistoquímicos avaliados (P16iNK4a, Ki 67 e hTert) 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 a subdivisão da positividade da expressão imunoistoquímicas dos marcadores avaliados (igual ou inferior a 10%, 11 a 50% e maior que 50%), visto que outros estudos analisaram tal variável quantitativamente em número absoluto. O estudo de Cardoso et al foi um dos poucos que mostrou significância estatística entre superexpressão de P16iNK4a e recorrência da doença, assim como o de Nam et al (21, 55). Fonseca et al publicou que a P16iNK4a estava superexpressa em 43% das recorrências, com intensidade forte em 58% delas, entretanto não foi estatisticamente significativo (P 0,1). A utilidade da avaliação da expressão desses biomarcadores seria determinar o risco de progressão das neoplasias intraepiteliais cervicais de colo uterino para carcinoma, o prognóstico e o sucesso do tratamento dessas displasias (61). Num grupo de 90 pacientes com neoplasia intraepitelial cervical com P16iNK4a e Ki67 superexpressas, houve progressão em 15 casos (17%), 2 casos no grupo de 25 pacientes com NIC I (8%) e 13 casos no grupo de 65 pacientes com NIC II (20%) (33). 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, com P 0,032.

Um estudo com 682 pacientes mostrou que as pacientes acometidas por neoplasias intraepiteliais cervicais tinham em média 37,8 anos, 63% eram fumantes e a recorrência foi de 11,1% após tratamento cirúrgico. Essa recorrência foi significativamente associada ao tabagismo e à graduação histológica, assim como margens positivas e persistência de HPV de alto risco. O fator idade não mostrou associação com recorrência (62). O risco de carcinoma cervical mostra-se 2 a 8 vezes maior em pacientes que tiveram a primeira relação sexual antes dos 18 anos e 3 a 6 vezes maior em mulheres com 6 ou mais parceiros sexuais. O tabagismo, o uso de anticoncepcionais orais e a multiparidade também são fatores de risco para câncer de colo uterino (63). O papiloma vírus humano apresenta prevalência de 54%, incidência de 45% e persistência de 34% em mulheres sexualmente ativas (64). No nosso estudo, a idade média das pacientes foi de 38 anos, 37% delas faziam uso de anticoncepcional oral e 26% delas não utilizavam nenhum método anticoncepcional. Apenas 31% delas eram tabagistas, a média de filhos era de 2 e a média da primeira relação sexual foi aos 16 anos. A maior parte das pacientes realizaram conização (79,8% delas). Os resultados anatomopatológicos mais frequentes foram NIC III (52%), seguidos da NIC I (14,9%) e NIC II (12,8%). 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 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 (59, 60, 65).

O marcador P16iNK4a mostra-se superexpresso em 90% ou mais das lesões intraepiteliais de alto grau, enquanto o Ki67 cora fortemente os núcleos celulares em mais de 50% das células com lesões displásicas moderadas ou severas (54). Em relação ao câncer de colo uterino, uma metanálise baseada em 15 publicações, com 1633 casos mostrou que tal marcador não tem associação com estadiamento, graduação histológica, tamanho do tumor ou invasão vascular. Porém, correlaciona-se com ausência de metástase linfonodal, aumento das sobrevidas geral e livre da doença (66). A expressão da P16iNK4a foi estatisticamente significativa nesse trabalho conforme a graduação histológica, pois foi 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, com $P = 0,026$. Observou-se que as NIC II têm menor percentual de positividade para P16iNK4a 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 Genoves que avaliou 92 pacientes, a P16iNK4a esteve superexpressa em 7 de 54 pacientes com NIC I e em 17 de 23 pacientes com NIC II. O trabalho ressalta que o diagnóstico de NIC II não deve ser baseado somente na positividade desse marcador, e que a ausência de expressão dele também não implica em regressão da lesão (18). Num outro trabalho com 6557 pacientes, a prevalência de P16iNK4a foi de 42,7% das NIC I, 75,5% das NIC II e 79,6% das NIC III. Nas pacientes com NIC I não tratadas e seguidas por 2 anos, há um risco de progressão para NIC II ou III naquelas com o marcador superexpresso, com um *odds ratio* de 1,43, porém com um intervalo de confiança de 0,5 a 3,9 (67). Tal marcador não apresenta qualquer valor prognóstico para predição de ausência de HPV de alto risco no seguimento de dois anos de pacientes tratadas com conização ou LEEP (68). Em relação ao risco de progressão das NIC II, um estudo que avaliou 52 pacientes acometidas com tal lesão, mostrou regressão da doença em 28 casos, progressão para NIC III em 13 casos e persistência da lesão em 11 casos. Naquelas que progrediram, 91% das lesões apresentavam P16iNK4a superexpresso com forte intensidade (69).

Em relação à hTert, a literatura também descreve a sua superexpressão em lesões intraepiteliais de alto grau (P menor de 0,001) em 88% a 90% das amostras (70, 71), enquanto as lesões intraepiteliais de baixo grau têm baixa expressão em 94% dos casos (70). Segundo Peters et al, mais de 90% das células malignas têm aumento na atividade da telomerase. Na avaliação de 50 pacientes, com idade média de 37 anos, 11 delas tinham o diagnóstico de NIC I e 18% de positividade para hTert, 17 tinham NIC II e 11 NIC III. Nas pacientes com NIC II e III a positividade para esse marcador foi de 28% (72). Em virtude do aumento da transcrição do gene hTert pela via E6 do HPV, 15% das NIC II progridem para NIC III (73). Pode-se inferir que a expressão desse 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 ($P = 0,024$) (74). Em nosso estudo, a

hTert não mostrou significância estatística em relação à graduação histológica (P 0,677), embora tenha-se mostrado positiva em 62,5% das NIC III, 53,8% das NIC II e 50% das NIC I.

Embora a expressão dos marcadores imunoistoquímicos 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 essa lesão tem, provavelmente, um comportamento de menor agressividade comparada à NIC III. Segundo Wilkinson et al, 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 sobretratamento principalmente em mulheres abaixo de 25 anos 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% (75). Mais estudos são necessários bem como a prospecção de novos marcadores potenciais a fim de estabelecer com melhor precisão as características dessas lesões, permitindo o manejo conservador naquelas que apresentam um comportamento mais indolente.

8. CONCLUSÕES

Os diagnósticos histológicos mais comuns após a conização foram NIC III (52%), NIC I (14,9%), NIC II (12,8%) e NIC II/III (12,8%).

A incidência de recorrência foi de 24,5% no seguimento de 2 anos.

A expressão dos marcadores imunoistoquímicos p16INK4a e Ki67 foi estatisticamente significativa conforme a graduação histológica.

Não houve associação entre a expressão do marcador imunoistoquímico hTert e graduação histológica.

A idade, o tabagismo, a idade da primeira relação sexual, o número de parceiros sexuais não mostrou correlação estatística com a graduação histológica, bem como com o risco de recorrência.

Não houve associação entre a expressão dos marcadores imunoistoquímicos e a recorrência da doença no período avaliado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wise J. Pilot study will assess whether HPV test should replace smears to screen for cervical cancer. *BMJ*. 2012;344:e3744.
2. W C. Pre invasive disease of the cervix. In: DiSaia P CW, Mannel R, McMeekin D, Mutch D, editor. *Clinical Gynecologic Oncology*. Philadelphia: Elsevier; 2012. p. 1-30.
3. Allameh T, Moghim S, Asadi-Zeidabadi M. A survey on the prevalence of high-risk subtypes of human papilloma virus among women with cervical neoplasia in Isfahan University of Medical Science. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;284(6):1509-13.
4. Ding X, Liu Z, Su J, Yan D, Sun W, Zeng Z. Human papillomavirus type-specific prevalence in women referred for colposcopic examination in Beijing. *J Med Virol*. 2014;86(11):1937-43.
5. Ministério da Saúde INdCI. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro 2011.
6. Martin CM, O'Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2011;25(5):605-15.
7. Otero-Motta AP, Ordonez JL, Gonzalez-Celador R, Rivas B, Macias Mdel C, Bullon A, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologic abnormalities from unvaccinated women living in north-western Spain. *APMIS*. 2011;119(3):204-15.
8. Kim JK, Jeon JS, Lee CH, Kim JW. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in Cheonan, Korea. *J Microbiol Biotechnol*. 2014;24(8):1143-7.
9. Konno R, Tamura S, Dobbelaere K, Yoshikawa H. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in healthy Japanese women aged 20 to 25 years old enrolled in a clinical study. *Cancer Sci*. 2011;102(4):877-82.
10. Bosch F QY, Castellsagué X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *International Journal Gynecology & Obstetrics*. 2006;94(Suplement 1):S8-S21.
11. Oh JK, Weiderpass E. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases. *Ann Glob Health*. 2014;80(5):384-92.
12. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010;202(12):1789-99.

13. Figueiredo Alves RR, Turchi MD, Santos LE, Guimaraes EM, Garcia MM, Seixas MS, et al. Prevalence, genotype profile and risk factors for multiple human papillomavirus cervical infection in unimmunized female adolescents in Goiania, Brazil: a community-based study. *BMC Public Health*. 2013;13:1041.
14. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 1993;12(2):186-92.
15. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(3):252-8.
16. Sjoeborg KD, Trope A, Lie AK, Jonassen CM, Steinbakk M, Hansen M, et al. HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia. *Gynecologic oncology*. 2010;118(1):29-34.
17. Sideri M, Igidbashian S, Boveri S, Radice D, Casadio C, Spolti N, et al. Age distribution of HPV genotypes in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic oncology*. 2011;121(3):510-3.
18. Genoves J, Alameda F, Mancebo G, Sole JM, Bellosillo B, Lloveras B, et al. Human papillomavirus detection and p16INK4a expression in cervical lesions: a comparative study. *Human pathology*. 2014;45(4):826-33.
19. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2005;14(5):1157-64.
20. Zhou H, Schwartz MR, Coffey D, Smith D, Mody DR, Ge Y. Should LSIL-H be a distinct cytology category?: A study on the frequency and distribution of 40 human papillomavirus genotypes in 808 women. *Cancer Cytopathol*. 2012;120(6):373-9.
21. 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.
22. Szalmas A, Konya J. Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(3):144-52.
23. Yildiz IZ, Usubutun A, Firat P, Ayhan A, Kucukali 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.
24. Roelens J, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus

testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cytopathol.* 2012;120(5):294-307.

25. Indarti J, Fernando D. Comparison of p16INK4a immunocytochemistry with the HPV polymerase chain reaction in predicting high grade cervical squamous intraepithelial lesions. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(9):4989-92.

26. Lambert AP, Anschau F, Schmitt VM. p16INK4A expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp Mol Pathol.* 2006;80(2):192-6.

27. Anschau F, Schmitt VM, Lambert AP, Goncalves MA, Machado DC. Transition of cervical carcinoma in situ to invasive cancer: role of p16 INK4a expression in progression and in recurrence. *Exp Mol Pathol.* 2009;86(1):46-50.

28. 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. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists.* 2013;32(1):76-115.

29. Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene.* 2011;30(18):2087-97.

30. Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle.* 2011;10(15):2497-503.

31. Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, et al. Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathol Res Pract.* 2006;202(10):731-7.

32. 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.

33. Kruse AJ, Baak JP, Janssen EA, Kjellekvold KH, Fiane B, Løvstett K, et al. Ki67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cell Oncol.* 2004;26(1-2):13-20.

34. Liu H, Liu S, Wang H, Xie X, Chen X, Zhang X, et al. Genomic amplification of the human telomerase gene (hTERC) associated with human papillomavirus is related to the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer. *Diagn Pathol.* 2012;7:147.

35. 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.
36. 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. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2007;26(3):214-22.
37. Wisman GB, De Jong S, Meersma GJ, Helder MN, Hollema H, de Vries EG, et al. Telomerase in (pre)neoplastic cervical disease. *Human pathology*. 2000;31(10):1304-12.
38. Schorge JO, Lee KR, Sheets EE. Prospective management of stage IA(1) cervical adenocarcinoma by conization alone to preserve fertility: a preliminary report. *Gynecologic oncology*. 2000;78(2):217-20.
39. Lindeque BG. Management of cervical premalignant lesions. *Best practice & research*. 2005;19(4):545-61.
40. Schorge J. HL, Bradshaw K., Schaffer J., Hoffmann B., Cunningham F. *Ginecologia de Williams*. Porto Alegre: Mc Graw Hill, Artmed; 2011.
41. Baloglu A, Uysal D, Bezircioglu I, Bicer M, Inci A. Residual and recurrent disease rates following LEEP treatment in high-grade cervical intraepithelial lesions. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;282(1):69-73.
42. Houfflin Debarge V, Collinet P, Vinatier D, Ego A, Dewilde A, Boman F, et al. Value of human papillomavirus testing after conization by loop electrosurgical excision for high-grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecologic oncology*. 2003;90(3):587-92.
43. Sarian LO, Derchain SF, Andrade LA, Tambascia J, Morais SS, Syrjanen 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. *Gynecologic oncology*. 2004;94(1):181-6.
44. 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.
45. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or

early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2006;367(9509):489-98.

46. Yin G, Li J, Zhu T, Zhao X. The detection of hTERC amplification using fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia: a case control study. *World J Surg Oncol*. 2012;10:168.

47. Zheng X, Liang P, Zheng Y, Yi P, Liu Q, Han J, et al. Clinical significance of hTERC gene detection in exfoliated cervical epithelial cells for cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(5):785-90.

48. 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.

49. 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.

50. Jiang YM, Chen CX, Li L. Meta-analysis of cold-knife conization versus loop electrosurgical excision procedure for cervical intraepithelial neoplasia. *Onco Targets Ther*. 2016;9:3907-15.

51. van Baars R, Griffin H, Wu Z, Soneji YJ, van de Sandt MM, Arora R, et al. Investigating Diagnostic Problems of CIN1 and CIN2 Associated With High-risk HPV by Combining the Novel Molecular Biomarker PanHPV4 With P16INK4a. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(11):1518-28.

52. Davis M, Feldman S. Making Sense of Cervical Cancer Screening Guidelines and Recommendations. *Curr Treat Options Oncol*. 2015;16(12):55.

53. 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.

54. Walts AE, Bose S. p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Human pathology*. 2009;40(7):957-64.

55. 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.

56. Samir R, Asplund A, Tot T, Pekar G, Hellberg D. High-risk HPV infection and CIN grade correlates to the expression of c-myc, CD4+, FHIT, E-cadherin, Ki-67, and p16INK4a. *J Low Genit Tract Dis*. 2011;15(4):280-6.

57. 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.
58. Rositch AF, Soeters HM, Offutt-Powell TN, Wheeler BS, Taylor SM, Smith JS. The incidence of human papillomavirus infection following treatment for cervical neoplasia: a systematic review. *Gynecologic oncology.* 2014;132(3):767-79.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. Lubrano A, Medina N, Benito V, Arencibia O, Falcon JM, Leon L, et al. Follow-up after LLETZ: a study of 682 cases of CIN 2-CIN 3 in a single institution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;161(1):71-4.
63. Harper DM, Demars LR. Primary strategies for HPV infection and cervical cancer prevention. *Clin Obstet Gynecol.* 2014;57(2):256-78.
64. Mollers M, Boot Hein J, Vriend Henrike J, King Audrey J, van den Broek Ingrid VF, van Bergen Jan EA, et al. Prevalence, incidence and persistence of genital HPV infections in a large cohort of sexually active young women in the Netherlands. *Vaccine.* 2013;31(2):394-401.
65. de Mello Silva MV, Coutinho IC, de Andrade Heraclio 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.
66. Lin J, Albers AE, Qin J, Kaufmann AM. Prognostic significance of overexpressed p16INK4a in patients with cervical cancer: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(9):e106384.
67. Liao GD, Sellors JW, Sun HK, Zhang X, Bao YP, Jeronimo J, et al. p16INK4A immunohistochemical staining and predictive value for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1: a prospective study in China. *Int J Cancer.* 2014;134(7):1715-24.
68. Roncaglia MT, Fregnani JH, Tacla M, SG DEC, Caiaffa HH, Ab'saber A, et al. Characterization of p16 and E6 HPV-related proteins in uterine cervix high-grade

lesions of patients treated by conization with large loop excision. *Oncol Lett.* 2013;6(1):63-8.

69. Omori M, Hashi A, Nakazawa K, Yuminamochi T, Yamane T, Hirata S, et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16INK4a immunoexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol.* 2007;128(2):208-17.

70. 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.

71. Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al. Upregulation of telomerase (hTERT) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus, virus persistence, or disease outcome in cervical cancer. *Diagn Cytopathol.* 2006;34(11):739-48.

72. Reesink-Peters N, Helder MN, Wisman GB, Knol AJ, Koopmans S, Boezen HM, et al. Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J Clin Pathol.* 2003;56(1):31-5.

73. Koskimaa HM, Kurvinen K, Costa S, Syrjanen K, Syrjanen S. Molecular markers implicating early malignant events in cervical carcinogenesis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2010;19(8):2003-12.

74. 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.

75. 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.

ANEXO A - PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

PACIENTE N° _____

EXAME N° _____

Nome _____

Idade _____ Escolaridade _____ MAC _____

IMC _____ Tabagismo _____ (Quantidade _____ Tempo _____)

Paridade _____ 1° relação sexual _____ N° parceiros sexuais _____

INDICAÇÃO CIRÚRGICA: _____

Cone () DATA _____

LEEP ()

ANATOMOPATOLÓGICO:

() NIC I

() NIC II

() NIC III

() Outros _____

IMUNOHISTOQUÍMICA:

p16INK4a _____

p16INK4aM _____

Ki67 _____

hTert _____

RECORRÊNCIA

() Sim () Não

() 6 meses () 12 meses () 18 meses () 24 meses

ANEXO B - OFÍCIO CEP N°

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS SUBTIPOS DE HPV E EXPRESSÃO DE TELOMERASE, KI-67 E P16INK4A EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS DE ALTO GRAU

Pesquisador: VINICIUS DUVAL DA SILVA

Versão: 1

CAAE: 39276114.6.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 109403/2014

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto AVALIAÇÃO DOS SUBTIPOS DE HPV E EXPRESSÃO DE TELOMERASE, KI-67 E P16INK4A EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS DE ALTO GRAU que tem como pesquisador responsável VINICIUS DUVAL DA SILVA, foi recebido para análise ética no CEP Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUC/RS em 28/11/2014 às 14:56.

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS SUBTIPOS DE HPV E EXPRESSÃO DE TELOMERASE, KI-67 E P16INK4A EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS DE ALTO GRAU

Pesquisador Responsável: VINICIUS DUVAL DA SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 39276114.6.0000.5336

Submetido em: 26/11/2014

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Situação da Versão do Projeto: Aprovado

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_437149

ANEXO C - ARTIGO ORIGINAL

RESUMO

Objetivo: Avaliar a associação entre graduação histológica e a expressão imunoistoquímica para P16iNK4a, hTert e ki67, a fim de estabelecer o comportamento dessas lesões quanto à recorrência durante o seguimento de dois anos. **Pacientes e Métodos:** Estudo de coorte histórica incluindo 94 mulheres, em que foram analisados 3 grupos de pacientes com lesões intraepiteliais cervicais de baixo (NIC I) e alto grau, classificadas em NIC II e III, submetidas à conização, a fim de determinar a recorrência da doença conforme a expressão dos marcadores imunoistoquímicos P16iNK4a, Ki67 e hTert. **Resultados:** A idade média das pacientes foi de 38,2 anos. Nas pacientes com NIC I, houve maior frequência de P16iNK4a ausente, nas pacientes NIC II ou I/II observou-se maior frequência com P16iNK4a $\leq 10\%$. Nas pacientes NIC III observou-se maior frequência de expressão de P16iNK4a ($>50\%$). Na categoria NIC I houve mais pacientes com Ki67 $\leq 10\%$ e menor frequência de Ki67 ($>50\%$). Na categoria NIC III houve menos pacientes na categoria Ki67 $\leq 10\%$ e no grupo NIC II e III houve mais pacientes com Ki67 ausente. Quando comparadas as expressões dos marcadores entre sujeitos com e sem recorrência, não houve diferenças estatisticamente significativas **Conclusão:** Houve uma associação estatisticamente significativa entre P16iNK4a, P16iNK4aM e Ki67 e a graduação histológica, entretanto não houve diferença estatística na expressão desses marcadores em relação à recorrência da doença no período avaliado. **Descritores:** neoplasia intraepitelial cervical, recidiva, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Objective: To evaluate association between histological grade of low (CIN I) and high-grade intraepithelial cervical lesions (CIN II and III) and the immunohistochemical expression of p16INK4a, hTert and ki67 in order to establish the behavior of these lesions and recurrence during follow-up of two years. **Patients and Methods:** a historical cohort study of 94 women to analyze 3 groups of patients with low (CIN I) and high-grade (CIN II and III) cervical intraepithelial lesions underwent to knife, to determine the recurrence of disease associated to expression of immunohistochemical markers p16INK4a, Ki67 and hTert. **Results:** Mean age of the patients was 38.2 years. Patients with CIN I, there was a lower p16INK4a expression, while in patients CIN II or I / II a higher frequency of p16INK4a $\leq 10\%$ was observed. In patients with CIN III there was a higher frequency of p16INK4a expression ($> 50\%$). There were more patients with Ki67 $\leq 10\%$ of the cell population and lower frequency of Ki67 expression ($> 50\%$) in CIN I. In CIN III there were fewer patients in the category Ki67 $\leq 10\%$ and CIN II and III group there were more patients with absent expression of Ki67. When comparing the markers between subjects with and without recurrence there was no statistically significant difference **Conclusion:** There was a statistically significant association between p16INK4a, P16iNK4aM and Ki67 and histological grade, however there was no statistical difference in the expression of these markers in relation to recurrence of disease during the study period.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia, recurrence, immunohistochemistry.

Avaliação da expressão de telomerase (hTert), Ki-67 e P16iNK4a em lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau

Introdução

O câncer de colo uterino é a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres (90% dos casos em países em desenvolvimento), sabe-se que no Brasil corresponde a 9,3% das neoplasias ginecológicas. Mundialmente, são diagnosticados 500.000 novos casos por ano, sendo responsável por 250.000 mortes anuais (1). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) recomenda que o rastreio citopatológico cervical seja feito a cada 3 anos após dois exames negativos consecutivos em pacientes com idade entre 25 e 64 anos, desde que as amostras sejam satisfatórias e representativas da junção escamo-colunar (2). A neoplasia maligna de colo uterino é precedida por uma longa fase de lesão precursora. Essa fase comumente é assintomática, são as neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), e pode perdurar por um período de 10 a 20 anos. A infecção é mais comum em pacientes jovens, entretanto comportamento sexual, idade, fumo, paridade e uso de contraceptivos são também fatores de risco para essa neoplasia. No ano de 1976 Zur Hausen demonstrou a relação entre a infecção pelo HPV e o surgimento de neoplasias do trato genital (1). 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 celulares (3). Com esse propósito, o uso de marcadores moleculares tem auxiliado a histopatologia na definição de casos duvidosos e para identificar mulheres de alto risco para recorrência (4). A P16iNK4a, uma proteína supressora tumoral, está superexpressa nos casos de displasia, apresentando alta sensibilidade por correlacionar-se com a severidade da displasia. Estudos atuais propõem que a

P16iNK4a é um biomarcador útil para lesões de alto risco e para prever progressão nas lesões de baixo risco. Tais trabalhos mostram uma associação significativa entre grau da lesão cervical e distribuição e intensidade da expressão da P16iNK4a (4, 5). O Ki67 é um outro marcador celular de proliferação expresso em todos os estágios do ciclo celular, exceto na fase G0, e que não está envolvido especificamente no processo carcinogênico cervical, contudo, tem um valor preditivo independente para graduar e avaliar progressão da doença (6). 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 e, conseqüentemente, a imortalidade celular no processo de progressão e, em várias neoplasias malignas, do comportamento de manutenção de populações celulares de diferentes imunofenótipos agressivos (7). A hTert está presente em 28,5% das NIC I, 87,5% das NIC II e 95% das NIC III (8). Dentre os tratamentos existentes para o manejo das neoplasias intraepiteliais cervicais, nosso hospital realiza 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, contudo é um procedimento que remove maior volume de estroma cervical, o que poderia acarretar desfechos reprodutivos adversos. A técnica de LEEP é um procedimento tecnicamente mais simples, e 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 causar estenose cervical em até 6% das pacientes (9). A literatura recomenda que as pacientes devem ser seguidas por no mínimo um ano com CP e colposcopia semestralmente após a cirurgia, por ser o período de maior risco de recorrência das lesões cervicais (10). A taxa de recorrência de LIEAG após excisão cirúrgica varia de 5 a 10% anteriormente (3, 11, 12). 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 membranas (13), analisar a associação entre recorrência após tratamento cirúrgico e a expressão dos marcadores imunoistoquímicos conforme a graduação das lesões intraepiteliais de alto e baixo grau permitiria a suspensão de um seguimento clínico rigoroso e reduziria sobrediagnóstica e sobretratamento nas pacientes acometidas por essa doença. Até o momento, não há descrição da avaliação concomitante dos três marcadores imunoistoquímicos - P16iNK4a, 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 P16iNK4a (14). Os demais marcadores ainda são pouco estudados e, portanto, há poucos trabalhos publicados em relação ao Ki67 e à hTert, não apresentando acurácia estabelecida para o emprego na prática clínica, embora pareçam mostrar diferença conforme a sua expressão entre as lesões de alto e baixo grau (15). Além disso, o comportamento da NIC II ainda é incerto, e até o momento essa lesão é tratada da mesma forma que a NIC III, conduta uniformizada a partir do consenso de Bethesda de 1991, entretanto, nos últimos anos têm-se questionado a sua agressividade, pois comporta-se de forma dúbia,

com significativo número de casos com boa evolução, regressão espontânea ou comportamento indolente (5, 6). Portanto, o estabelecimento de marcadores de risco de recorrência em relação a esse tipo de lesão é inovador, a fim de que se possa definir quais delas necessitam tratamento cirúrgico e quais sejam passíveis de se manter em seguimento. Essa resposta ainda não existe na literatura.

Métodos

Trata-se de um estudo de coorte histórica em que foram analisadas 94 pacientes divididas em 3 grupos com lesões intraepiteliais cervicais de baixo (NIC I) e alto grau (NIC II e III) submetidas à conização ou à LEEP. As pacientes foram seguidas por dois anos, a fim de determinar a recorrência da doença. AMOSTRA: Pacientes do ambulatório de ginecologia do hospital São Lucas da PUCRS que realizaram exame citopatológico cervical seguido por colposcopia com biópsia das áreas suspeitas, com diagnóstico subsequente de NIC recrutadas por amostragem de conveniência (consecutiva). Todos os casos do estudo foram revisados por um segundo patologista com experiência diagnóstica superior a vinte anos. Foi preenchido um protocolo de coleta de dados que consta de dados de anamnese e de diagnóstico anatomopatológico. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: Pacientes a partir de 18 anos submetidas a 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 respectivas peças cirúrgicas com margens livres de neoplasia intraepitelial cervical. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: Pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou com outras desordens imunossupressivas e gestantes. TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA: 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 desparinizadas em estufa histológica com temperatura de 69°C, 2 incubações em xilol, 5 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 biotilado e complexo avidina-HRP. A marcação foi realizada utilizando como cromógeno a Diamina Benzidina (DAB, DAKO). Por fim as lâminas foram contra coradas 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 P16iNK4a, MM1 para Ki67 e 2C4 para hTert. Para detecção de P16iNK4a, Ki67 e hTert foram utilizados como controles negativos, lâminas sem neoplasia intraepitelial cervical; e foram utilizados como controles positivos lâminas com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC III).

INTERPRETAÇÃO DA P16iNK4A, Ki67 e hTert: A coloração nuclear foi considerada positiva para as células que expressaram P16iNK4a. A intensidade de expressão para P16iNK4a nas neoplasias intraepiteliais cervicais foi graduada como negativa se nenhuma das células expressaram coloração, positivo se expressaram coloração conforme percentual (menos de 10%, 11 a 50% ou mais de 50%). Também a P16iNK4a foi graduada conforme a intensidade da coloração em fraca, moderada e forte. 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. ANÁLISE ESTATÍSTICA: Foram digitados os dados 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%. ASPECTOS ÉTICOS: O projeto foi aprovado pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde e pelo Comitê de Ética/PUCRS.

Resultados

O grupo apresentou média de idade de 38,2 anos e desvio padrão de 11,7. A maior parte das pacientes utilizava anticoncepcional oral combinado como método anticoncepcional e não fumava. Fizeram na sua maioria cone, pertenciam ao grupo NIC III e, dentre as recorrências, a mais frequente foi a NIC I seguida da NIC III.

A recorrência foi mais comum nas pacientes que realizaram LEEP (31%) enquanto naquelas submetidas à conização foi de 22%. Houve uma associação estatisticamente significativa entre P16iNK4a, P16iNK4aM e Ki67 e a graduação histológica (Tabela 1).

Tabela 1. Tabela comparativa da graduação histológica em relação a expressão imunoistoquímica dos marcadores

	NIC I	NIC I/II e II	NIC III	NIC II e III	P
P16iNK4a					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)	
P16iNK4aM					0,034
Fraca	2 (15,4)	2 (15,4)	4 (8,3)	-	
Moderada	2 (15,4)	-	5 (10,4)	3 (25,0)	
Forte	2 (15,4)	7 (53,8)	30 (62,5)	3 (25,0)	
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 resíduo ajustado teve valor absoluto maior que 1,96.

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 não houve diferença significativamente estatística em relação à recorrência da doença. Quando se comparou os marcadores entre sujeitos com e sem recorrência não houve também diferenças estatisticamente significativas.

Discussão

A neoplasia maligna de colo uterino é, dentre todos os carcinomas, a de maior potencial de prevenção, entretanto torna-se um problema de saúde pública, em virtude de que estudos mostram incidência e mortalidade altas em países em desenvolvimento, enquanto é uma doença bem controlada em países desenvolvidos que têm programas efetivos de rastreamento (16). Estudos mostram que os marcadores imunoistoquímicos P16iNK4a e Ki67 têm maior acurácia em identificar lesões precursoras em pacientes com menos de 30 anos e CP demonstrando LIEBG. Constatou-se que a expressão desses marcadores está associada a severidade das lesões histológicas. No estudo de Possati-Resende et al, 18 pacientes realizaram biópsia de colo uterino, e a expressão de P16iNK4a e Ki67 estava presente em 46,5% dos NIC I, 82,8% dos NIC II e 92,8% dos NIC III (16). Em nosso trabalho, a P16iNK4a esteve superexpressa pelo método imunoistoquímico em mais de 50% das células de cada amostra em 43,3% dos casos, apresentando 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 tem-se reduzido, observa-se diagnósticos e tratamentos excessivos de lesões cervicais com alto potencial de regressão. Nesse contexto, o uso de marcadores imunoistoquímicos ligados à superexpressão de E6 e E7 na histologia auxiliam na avaliação dessas lesões (17). Conforme *guidelines* americanos, pacientes que

apresentam neoplasia intraepitelial cervical suspeita de alto grau e p16INK4a superexpressa, beneficiariam-se de tratamento cirúrgico. A positividade para esse marcador está ligada ao início da transformação oncogênica para desenvolvimento do câncer; utilizá-la detectaria lesões pré-neoplásicas e reduziria tratamentos desnecessários (17). A importância da avaliação desses marcadores deve-se ao fato da ampla variabilidade inter e intra-observador e pobre reprodutibilidade dos critérios citomorfológicos principalmente quanto a classificação em três categorias é utilizada (NIC), utilizando hematoxilina e eosina para o diagnóstico das neoplasias intraepiteliais cervicais, limitação que este trabalho procurou minimizar pela concordância de diagnóstico entre dois patologistas: o interpretador original do caso e o revisor. O uso desses marcadores complementa os diagnósticos duvidosos, evitando tratamentos desnecessários (18, 19). A análise 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% (20). A literatura mostra que os marcadores imunoistoquímicos avaliados (P6iNK4a, Ki67, hTert) estão claramente associados à graduação histológica, alguns 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 a 10%, conforme já citado anteriormente (3, 11, 12). Contudo, no estudo de Serati et al, que seguiu pacientes durante dez anos, a recorrência ocorreu em 19,4% das excisões com margens livres, e foi duas vezes mais comum após o LEEP (21). Embora tenha sido incluído apenas peças cirúrgicas com margens livres na população do estudo, a incidência de recorrência foi de 24,5%, que é elevada comparada às taxas descritas na

literatura. Contudo, Malapati et al seguiu 717 pacientes elegíveis após LEEP e a persistência / recorrência no pós-operatório foi de 24,7% (22). O tipo de recorrência mais comum foi a NIC I (47,8%), seguida da NIC III (34,8%), a maior parte das recorrências ocorreram nos primeiros 6 meses após o tratamento (56% delas). Não houve diferença entre a expressão dos marcadores imunoistoquímicos avaliados (P16iNK4a, Ki 67 e hTert) 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 a subdivisão da positividade da expressão imunoistoquímicas dos marcadores avaliados (igual ou inferior a 10%, 11 a 50% e maior que 50%), visto que outros estudos analisaram tal variável quantitativamente em número absoluto, método que ainda apresenta limitações para implementação na rotina diagnóstica na patologia cirúrgica. O estudo de Cardoso et al foi um dos poucos que mostrou significância estatística entre superexpressão de P16iNK4a e recorrência da doença, assim como o de Nam et al (3, 23). Fonseca et al publicou que a P16iNK4a estava superexpressa em 43% das recorrências, com intensidade forte em 58% delas, entretanto não foi estatisticamente significativo ($P = 0,1$) (24). Num grupo de 90 pacientes com neoplasia intraepitelial cervical com P16iNK4a e Ki67 superexpressas, houve progressão em 15 casos (17%), 2 casos no grupo de 25 pacientes com NIC I (8%) e 13 casos no grupo de 65 pacientes com NIC II (20%) (20). 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, com $P = 0,032$. No nosso estudo, a idade média das pacientes foi de 38 anos, 37% delas faziam uso de anticoncepcional oral e 26% delas não utilizavam nenhum método anticoncepcional. Apenas 31% delas eram tabagistas, a média de filhos era de 2 e a média da primeira relação sexual foi aos

16 anos. A maior parte das pacientes realizou conização (79,8% delas). Os resultados anatomopatológicos mais frequentes foram NIC III (52%), seguidos da NIC I (14,9%) e NIC II (12,8%). 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 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 (22, 25, 26). A expressão da P16iNK4a foi estatisticamente significativa nesse trabalho conforme a graduação histológica, pois foi 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, com $P = 0,026$. Observou-se que as NIC II têm menor percentual de positividade para P16iNK4a 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 Genoves que avaliou 92 pacientes, a P16iNK4a esteve superexpressa em 7 de 54 pacientes com NIC I e em 17 de 23 pacientes com NIC II. O trabalho ressalta que o diagnóstico de NIC II não deve ser baseado somente na positividade desse marcador, e que a ausência de expressão dele também não implica em regressão da lesão (5). Em relação ao risco de progressão das NIC II, um estudo que avaliou 52 pacientes acometidas com tal lesão, mostrou regressão da doença em 28 casos, progressão para NIC III em 13 casos e persistência da lesão em 11 casos. Naquelas que progrediram, 91% das lesões apresentavam P16iNK4a superexpresso com forte intensidade (27). Em relação à hTert, a literatura também descreve a sua superexpressão em lesões intraepiteliais de alto grau (P menor de 0,001) em 88% a

90% das amostras, enquanto as lesões intraepiteliais de baixo grau têm baixa expressão em 94% dos casos (28). Pode-se inferir que a expressão desse 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 ($P = 0,024$) (29). Em nosso estudo, a hTert não mostrou significância estatística em relação à graduação histológica ($P = 0,677$), embora tenha-se mostrado positiva em 62,5% das NIC III, 53,8% das NIC II e 50% das NIC I. Embora a expressão dos marcadores imunoistoquímicos 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 essa lesão tem, provavelmente, um comportamento de menor agressividade comparada à NIC III. Segundo Wilkinson et al, 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 sobretratamento principalmente em mulheres abaixo de 25 anos 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% (30). Portanto, mais estudos são necessários bem como a prospecção de novos marcadores potenciais a fim de estabelecer com melhor precisão as características dessas lesões, permitindo o manejo conservador naquelas que apresentam um comportamento mais indolente.

Conclusões

Embora seja comprovada na literatura a importância do uso de marcadores imunoistoquímicos na progressão de neoplasias intraepiteliais cervicais, também comprovadas nesse trabalho; não houve associação do uso desses marcadores na avaliação da recorrência dessas lesões displásicas. Tal estudo apresentou limitações que poderiam justificar tais achados, tais como número pequeno de

pacientes, bem como aferição de variáveis qualitativas ao invés de categóricas. Portanto, mais estudos são necessários bem como a prospecção de novos marcadores potenciais a fim de estabelecer com melhor precisão as características dessas lesões, permitindo o manejo conservador naquelas que apresentam um comportamento mais indolente.

Referências

1. Wise J. Pilot study will assess whether HPV test should replace smears to screen for cervical cancer. *BMJ*. 2012;344:e3744.
2. Ministério da Saúde INdCI. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro 2011.
3. 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.
4. Yildiz IZ, Usubutun A, Firat P, Ayhan A, Kucukali 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.
5. Genoves J, Alameda F, Mancebo G, Sole JM, Bellosillo B, Lloveras B, et al. Human papillomavirus detection and p16INK4a expression in cervical lesions: a comparative study. *Human pathology*. 2014;45(4):826-33.
6. Martin CM, O'Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2011;25(5):605-15.
7. 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.
8. 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. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2007;26(3):214-22.
9. Lindeque BG. Management of cervical premalignant lesions. *Best practice & research*. 2005;19(4):545-61.
10. W C. Pre invasive disease of the cervix. In: DiSaia P CW, Mannel R, McMeekin D, Mutch D, editor. *Clinical Gynecologic Oncology*. Philadelphia: Elsevier; 2012. p. 1-30.
11. Sarian LO, Derchain SF, Andrade LA, Tambascia J, Morais SS, Syrjanen 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. *Gynecologic oncology*. 2004;94(1):181-6.
12. 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.
13. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskeva E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2006;367(9509):489-98.
14. 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. *International*

journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists. 2013;32(1):76-115.

15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Walts AE, Bose S. p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Human pathology*. 2009;40(7):957-64.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. de Mello Silva MV, Coutinho IC, de Andrade Heraclio 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.
27. Omori M, Hashi A, Nakazawa K, Yuminamochi T, Yamane T, Hirata S, et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16INK4a immunoexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(2):208-17.
28. 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.
29. 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.
30. 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.

ANEXO D - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO**sgp@sgponline.com.br**

Hoje 01:21

Você

[Responder](#) |

Ilmo(a) Sr.(a)
Prof(a), Dr(a) Ana Paula

Referente ao código de fluxo: 698
Classificação: Artigo original

Informamos que recebemos o manuscrito "

Avaliação da expressão de telomerase (hTert), Ki67 e P16iNK4a em lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau

". Ele será enviado para apreciação dos revisores com vistas à publicação na revista Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número do código de fluxo apresentado acima.

O(s) autor(es) declara(m) que o presente trabalho é inédito e o seu conteúdo não foi nem está sendo considerado para publicação em outro periódico brasileiro ou estrangeiro, impresso ou eletrônico.

Obrigado por submeter seu trabalho à revista Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões

Atenciosamente,