

AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA P16 EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE: COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE ANÁLISES

Dias AMR^{*1,2}, Buexm LA², Faria PAS³, Dias FL⁴, Pinto LFR², Lourenço SQC^{1,2}

¹DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA – Universidade Federal Fluminense (UFF), Rio de Janeiro/Brasil
²PROGRAMA DE CARCINOGENESE MOLECULAR - Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro/Brasil
³SERVIÇO DE CABEÇA E PESCOÇO - Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro/Brasil

*anadias257@gmail.com

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEO) representa 90 a 95% dos tumores encontrado nessa região, representando um desafio no controle e tratamento oncológico. O aumento de sua incidência tem sido atribuído, em especial, a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Um dos marcadores que vem sendo estudado em CCE de cavidade oral e orofaringe é a proteína p16, que age como supressora tumoral, inibindo as quinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6) que regulam o ponto G1 de checagem do ciclo celular.

A expressão do p16 é intensa e difusamente identificada em tumores associados ao HPV, mas ausente ou pouco expressa em carcinomas HPV negativos. Entre as técnicas utilizadas atualmente para a detecção do HPV temos a detecção por imuno-histoquímica da proteína p16. Entretanto, a forma de análise da expressão dessa proteína é distinta na literatura.

OBJETIVO

Comparar diferentes metodologias de análise da imunopositividade da proteína p16 em CCEO diagnosticados no Instituto Nacional de Câncer (INCA) entre 01 de janeiro de 2002 a 31 de dezembro de 2010.

MATERIAL E MÉTODOS

População de Estudo: Peças cirúrgicas oriundas de biópsias ou exérese tumorais, dados sócio-demográficos e clínico-patológicos de pacientes diagnosticados de CCEO no INCA.

Avaliação Histopatológica: Sistema de classificação OMS (grau de diferenciação) e Avaliação Histopatológica proposta por BRODERS (1941) foram aplicados.

Avaliação Imuno-histoquímica: Para avaliação da imunoposição da proteína p16 foi utilizado o sistema *CINtec® p16 Histology kit (mtm Laboratories, AG, Germany)* no sistema de automação *Ventana Benchmark Autostainer*, seguindo as especificações oferecidas pela fabricante Roche®. A expressão foi analisada segundo Evans *et al.*, 2013, que consideram positivo para p16 os casos com marcação nuclear e citoplasmática forte e difusa presente em mais de 70% das células neoplásicas. Outra classificação avaliada foi proposta por Jordan *et al.*, 2012, que descreveram uma análise semiquantitativa obtida pelo produto da intensidade de marcação (avaliadas em uma escala de 0 a 3) e a porcentagem de células tumorais coradas em cada nível e de intensidade (0 a 100%), denominado H-score. Portanto, os valores para o H-Score variam de 0 a 300 e o ponto de corte estabelecido para células positivas foi considerado como 60. Cada lâmina foi avaliada independentemente por 2 patologistas (Tabela 1).

Análise Estatística: Foram realizadas análises bivariadas (Teste χ^2), de sobrevida (Kaplan-Meier) e *Log rank* para comparação das curvas, com nível de significância igual ou menor que 0,05.

Tabela 1: Análise da proteína p16 proposta por diferentes autores

	Tipo de Marcação	Positividade para p16
Evans <i>et al.</i>, 2013	Nuclear e Citoplasmática; Forte e Difusa.	< 70%
Jordan <i>et al.</i>, 2012	Intensidade de marcação X Porcentagem de células tumorais coradas = H-score.	< 60

RESULTADOS

Perfil da População de Estudo: Total de 346 pacientes foram incluídos no estudo. Homens (89,8%), brancos (48,0%), com idade entre 41 e 60 anos (59,0%) foram os mais acometidos. Predominaram pacientes com primeiro grau incompleto (62,4%), tabagistas ou ex-tabagistas (94,5%) e etilistas ou ex-etilistas (88,2%) com tumores em palato mole (20,7%) e tumores que acometiam dois ou mais sítios (68,8%), tratados inicialmente com radioterapia (56,9%), que não realizaram tratamento adjuvante (92,2%) e em estadiamento clínico IV (54,9%). Foram identificados 84 casos de progressão da doença (24,3%), 96 casos (27,7%) de recidiva, principalmente local (71,9%) e 17 casos de segundo tumor primário (4,9%). A maioria dos pacientes havia falecido até o encerramento da coleta de dados (75,4%) e destes 97,2% vieram a óbito pelo câncer.

Análise Histopatológica: Predominaram os tumores moderadamente diferenciados (79,8%) segundo a Gradação Histopatológica da OMS (BARNES *et al.*, 2005) e tumores Broders 3 de acordo com a Classificação Histopatológica proposta por BRODERS (1941). **Análise Imuno-histoquímica:** A reação imuno-histoquímica foi realizada em 344 casos. Predominaram os tumores p16 negativos em ambas as classificações. Utilizando o *cut-off* de 70%, 312 casos foram negativos (90,6%) e aplicando o *cut-off* do H-score de 60, 270 casos foram negativos (78,4%) (Figura 1).

Análise Estatística: Tumores em estágio clínico IV mostraram associação com parâmetros que indicam o comportamento agressivo, como óbito e também óbito por câncer.

Houve associação entre a negatividade para a classificação de Evans *et al.* (2013) e cor da pele não-branca ($p=0,030$) e ausência de recidiva ($p=0,033$). E associação entre a ausência de imunoposição pela classificação do H-score de Jordan *et al.* (2012) e cor da pele não-branca ($p=0,020$). Também houve associação entre as duas classificações usadas para a imunoposição da proteína p16, onde a negatividade para a classificação de Evans *et al.* (2013) está associada a ausência de imunoposição pela classificação do H-score de Jordan *et al.* (2012) ($p<0,0001$). (Tabela 2). A sobrevida global média dos pacientes foi de 24,68 meses, sobrevida livre de doença 20,71 meses e sobrevida específica 24,41 meses. (Gráficos 1, 2 e 3).

Tabela 2: Associação entre as duas classificações usadas para a imunoposição da proteína p16 (n=344).

Variável	Classificações Imuno-histoquímicas - proteína p16			p
	Categoria > 70% (Evans <i>et al.</i> , 2013)			
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		
≥ 60 (Jordan <i>et al.</i> , 2012)	Negativo n (%)	270 (78,5%)	0 (-)	<0,0001
	Positivo n (%)	42 (12,2%)	32 (9,3%)	

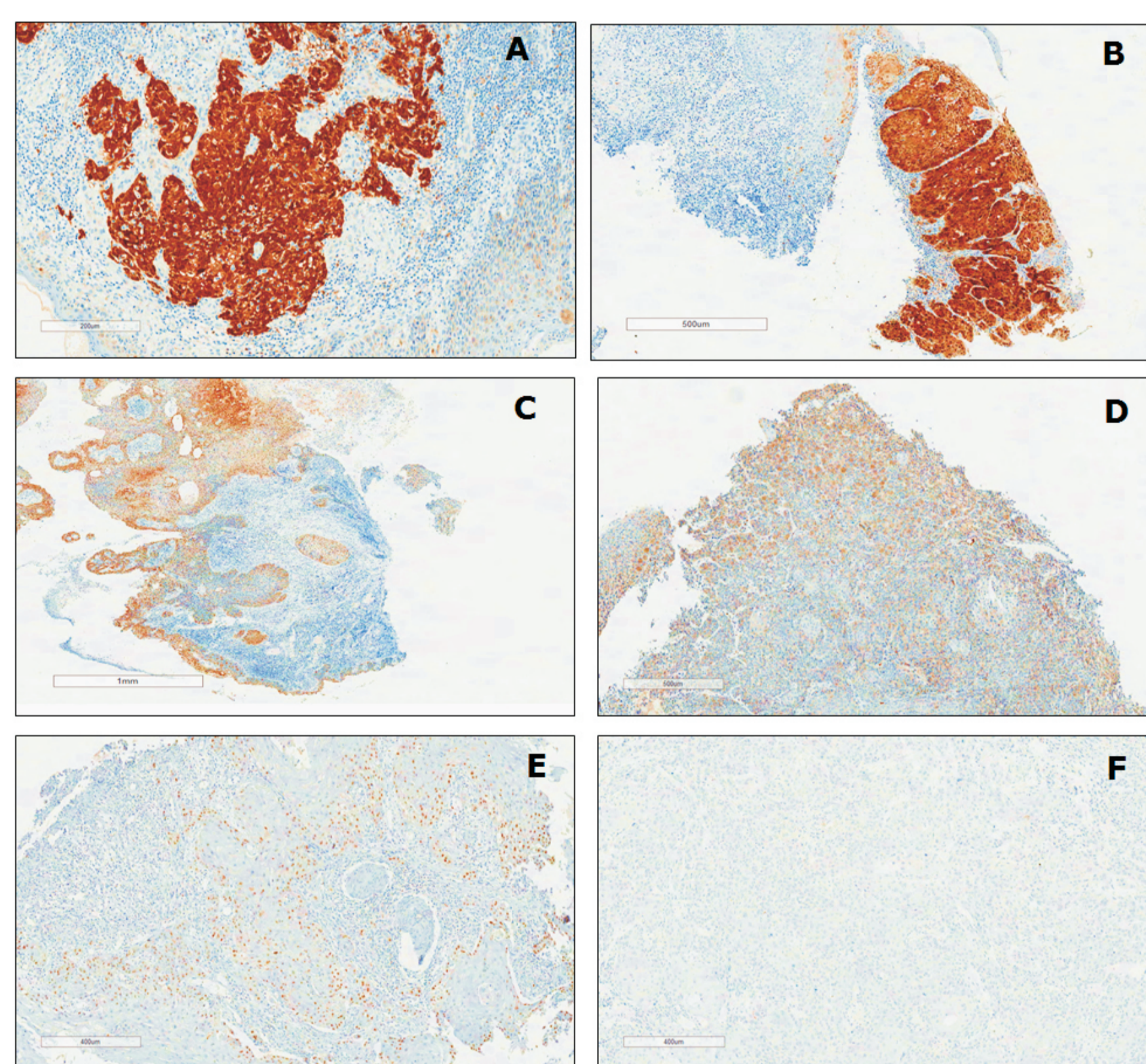


FIG. 1: Fotomicrografias da reação imuno-histoquímica do anticorpo anti-p16. A CCEO - considerado positivo pelas duas classificações; B CCEO - considerado positivo pelas duas classificações; C CCEO - considerado positivo pela classificação do H-score; D CCEO - considerado positivo pela classificação do H-score; E CCEO - considerado negativo pelas duas classificações; F CCEO - considerado negativo pelas duas classificações.

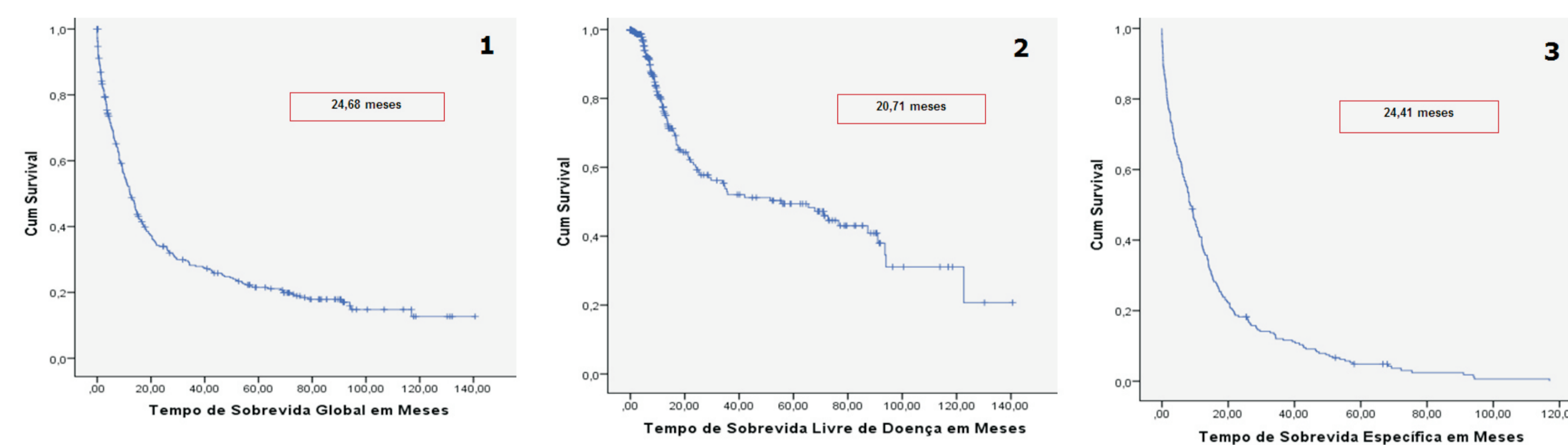


Gráfico 1: Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida global média (n=346); 2: Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de doença média (n=346); 3: Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida específica de doença média (n=346).

CONCLUSÕES

- Houve associação do estágio clínico IV com indicadores histopatológicos de agressividade, como tumores que acometem de dois sítios ou mais, com tamanho do tumor primário maior de 6cm - cT4, onde o tumor disseminou para os linfonodos regionais se espalhando para um ou mais linfonodos do mesmo lado que o tumor primário com até 6cm - cN2, com óbito e óbito por câncer.
- A ausência de imunoposição da proteína p16 está associada a ausência de recidiva.
- A utilização de diferentes classificações para a imunoposição da proteína p16 não apresentou resultados muito distintos. No entanto a classificação proposta por Evans *et al.* (2013) demonstrou maior valor prognóstico no que diz respeito a presença de recidiva.

- Estadiamento clínico IV, tratamento inicial de suporte e presença de progressão da doença parecem ser importantes fatores prognósticos na população estudada, pois apresentaram associação com sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida específica.
- A população de estudo apresenta tumores em estadiamentos avançados e mesmo quando submetidos a tratamento com intenção curativa, apresentam baixíssimos índices de sobrevida, evidenciando o comportamento agressivo do CCEO através dos diversos parâmetros investigados.

Projeto Gráfico: Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica / INCA

REFERÊNCIAS

- BARNES L. *et al.* World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005.
 EVANS, M. *et al.* Human Papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: an observational study of diagnosis, prevalence and prognosis in a UK population. *BMC Cancer*, 13: 220-230, 2013.
 JORDAN, R. C *et al.* Validation of Methods for Oropharyngeal Cancer HPV Status Determination in US Cooperative Group Trials. *Am J Surg Pathol*, 36(7): 945-954, 2012