

JÚLIO CÉSAR POSSATI RESENDE

**DETECÇÃO DE LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU EM MULHERES COM
CITOLOGIA DE ASC-US E LIEBG: COMPARAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA
DOS BIOMARCADORES P16/Ki-67 E TESTE MOLECULAR DE DNA-HPV DE ALTO RISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

ORIENTADOR: Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

Barretos – São Paulo

2014

JÚLIO CÉSAR POSSATI RESENDE

**DETECÇÃO DE LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU EM MULHERES COM
CITOLOGIA DE ASC-US E LIEBG: COMPARAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA
DOS BIOMARCADORES P16/Ki-67 E TESTE MOLECULAR DE DNA-HPV DE ALTO RISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

ORIENTADOR: Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

Barretos – São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Vanessa Alves Zagatto CRB 8/8638
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

R433d Resende, Júlio César Possati.

Detecção de lesão intraepitelial cervical de alto grau em mulheres com citologia de ASC-US e LIEBG: comparação entre a expressão imunocitoquímica dos biomarcadores P16/Ki-67 e teste molecular de DNA-HPV de alto risco. / Júlio César Possati Resende. - Barretos, SP 2014.

87 f. : il.

Orientador: Dr. Cristovam Scapulatempo Neto.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2014.

1. Colo do útero. 2. Neoplasia Intraepitelial Cervical. 3. Testes de DNA para Papilomavírus Humano. 4. Imunoistoquímica. 5. Antígeno Ki-67. 6. Inibidor p16 de Quinase Ciclina-Dependente. I. Autor. II. Scapulatempo Neto Cristovam.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Júlio César Possati Resende

Detecção de lesão intraepitelial cervical de alto grau em mulheres com citologia de ASC-US e LIEBG: comparação entre a expressão imunocitoquímica dos biomarcadores P16/Ki-67 e teste molecular de DNA-HPV de alto risco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 24/02/2014

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain
Instituição: Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

Prof. Dr. Gustavo Rubino de Azevedo Focchi
Instituição: Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Patologia - UNIFESP

Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto
Orientador

Prof. Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani
Presidente da Banca

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha auxiliado em algumas análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

*Dedico à Íris, meu amor, sem a qual não me sustentaria na dedicação aos estudos,
aos meus pais que sempre me impulsionaram na busca pelo conhecimento e ao
pequeno Arthur por trazer para nossa família seu mágico sorriso e a experiência
da felicidade infinita.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Cristovam Scapulatempo Neto, por confiar em mim a condução desse projeto e pelo seu exemplo de dedicação ao trabalho, especialmente à Patologia, com entusiasmo e dinamismo invejáveis. Agradeço pelas horas diante do microscópio nas quais dialogamos com as mensagens transmitidas pelas células e estreitamos nossa amizade.

Ao Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani, pelo estímulo para iniciar na vida científica e pela parceria indispensável e enriquecedora na estruturação e desenvolvimento do Setor de Ginecologia do Departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos.

Ao Dr. Edmundo Carvalho Mauad, por me apresentar o mundo da “Prevenção em Câncer” e confiar de maneira irrestrita no meu trabalho me possibilitando valiosa oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Adhemar Longatto Filho, pela generosa disponibilidade em atender prontamente minhas solicitações sempre com sorrisos e o bom humor peculiar a todos os homens muito inteligentes.

Aos amigos **Dr. Thiago Buosi Silva**, pelo companheirismo diário e auxílio imprescindível na revisão e formatação da dissertação e **Dr. Márcio Antoniazzi**, pela parceria no exercício da ginecologia e generosidade em me substituir nas ocasiões onde precisei me ausentar.

À todos os colaboradores do Departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos, em especial a **Etelvina de Oliveira Faria** e **Sinval Tadeu Biot**, pelo empenho à causa do câncer cervical e profissionalismo admirável.

Aos membros da banca de qualificação, **Dr. Gustavo Rubino de Azevedo Focchi** e **Dr. Luiz Fernando Lopes**, pelas valiosas críticas e sugestões durante a elaboração da dissertação.

À **Dra. Lígia Maria Kerr**, pela revisão de todas as amostras histopatológicas da pesquisa.

Aos funcionários do Setor de Citologia e Imunocitoquímica do Laboratório de Patologia do HCB em especial à competentíssima **Ivanete Eliane da Silva**.

Aos colaboradores no Núcleo de Apoio ao Pesquisador (NAP), em especial à **Rossana Verônica Mendoza López** pelo auxílio nas análises estatísticas da dissertação.

*“Muitas coisas não ousamos empreender por parecerem difíceis,
entretanto, são difíceis porque não ousamos empreendê-las.”*

Sêneca

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia do câncer do colo do útero.....	1
1.2	História natural do câncer do colo do útero	3
1.3	Limitações do teste de Papanicolaou no rastreio do câncer cervical.....	4
1.4	Contribuição do teste de DNA-HPV no rastreio do câncer cervical.....	6
1.5	Emprego de biomarcadores moleculares na detecção de lesões intraepiteliais do colo uterino	8
1.5.1	Utilização dos biomarcadores p16 ^{INK4a} e Ki-67	8
2	OBJETIVO.....	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1	Delineamento do estudo	14
3.2	População do estudo	14
3.3	Metodologia.....	15
3.3.1	Coloração imunocitoquímica combinada de p16 ^{INK4a} + Ki-67	17
3.3.2	Detecção qualitativa de HPV de alto risco oncogênico	18
3.4	Definições das variáveis do estudo	19
3.5	Análise estatística.....	20
3.6	Aspectos éticos	20
4	RESULTADOS.....	22
4.1	Descrição da população.....	22
4.1.1	Descrição das características sociodemográficas.....	22
4.1.2	Descrição das características clínico-reprodutivas.....	23
4.1.3	Descrição dos exames de citologia cervical (Papanicolaou)	24
4.1.4	Descrição dos achados colposcópicos e histopatológicos	25
4.2	Resultados dos testes para detecção de HPV de alto risco oncogênico.....	29
4.2.1	Sensibilidade e especificidade da pesquisa de DNA-HPV no diagnóstico de lesões intraepiteliais de alto grau (NICII/III)	29
4.2.2	Resultados dos testes imunocitoquímicos (ICQ) para pesquisa combinada dos biomarcadores p16 ^{INK4a} e Ki-67	32

4.2.3 Sensibilidade e especificidade do teste de imunocitoquímica no diagnóstico de lesões intraepiteliais de alto grau (NICII/III)	33
4.3 Desempenho comparativo entre os testes de detecção de HPV-AR e ICQ na predição de lesão intraepitelial de alto grau	35
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	60
Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido	61
Anexo B – Questionário padronizado	64
Anexo C – Parecer do comitê de ética em pesquisa da Fundação Pio XII	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna do colo do útero, por 100 mil mulheres brasileiras, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (Fonte: modificado da referência 2). 2
- Figura 2** – (A) Sensibilidade e especificidade de seis diferentes testes de HPV para detecção de lesões NIC2+ em amostras de citologia em meio líquido. (B) Sensibilidade e especificidade de seis diferentes testes de HPV para detecção de lesões NIC3+ em amostras de citologia em meio líquido (Fonte: extraído da referência 32). 7
- Figura 3** – Fluxograma demonstrativo da metodologia utilizada na avaliação colposcópica das pacientes e realização dos testes para detecção de lesão intraepitelial de alto grau 16
- Figura 4** – Exemplo de resultado positivo para o teste de imunocitoquímica demonstrando a dupla coloração celular núcleo/citoplasma (Ki-67/p16)⁵² (Fonte: referência 52) 18
- Figura 5** – Número e porcentagem de pacientes segundo o resultado da avaliação colpo-histológica e a citologia cervical (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 27
- Figura 6** – Representação gráfica da porcentagem de pacientes segundo o resultado da avaliação colpo-histológica de acordo com o teste de Papanicolaou inicial (estratificadas por faixa etária). 28
- Figura 7** – Exemplo de avaliação colposcópica com presença de achados maiores sugestivos de lesão intraepitelial de alto grau em paciente com Papanicolaou de LIEBG. (A e B) Aspecto colposcópico após aplicação de solução de ácido acético a 5%. (C) Imagem da lesão cervical após aplicação de solução de lugol a 5%. 28
- Figura 8** – Distribuição dos resultados do teste para detecção do Papilomavírus Humano (HPV) de acordo com o diagnóstico colpo-histológico entre as mulheres com citologia cervical de ASC-US e LIEBG. 30
- Figura 9** – Sensibilidade, especificidade, VPN e VPP do Teste Cobas 4800® na detecção de lesões precursoras (NICII/III) entre pacientes com citologia de ASC-US e LIEBG. 32

Figura 10 – Sensibilidade, especificidade, VPN e VPP da imunocitoquímica (CINtec® PLUS) na detecção de lesões precursoras (NICII/III) entre pacientes com citologia de ASC-US e LIEBG.	34
Figura 11 – Exemplos de testes positivos para a dupla marcação nuclear com Ki-67 (avermelhada) e citoplasmática com p16 (acastanhada) entre pacientes do grupo de estudo. A e D com aumento de 200X, B e C com aumento de 400X.	35
Figura 12 – Curva ROC representativa do desempenho dos testes Cobas 4800® e CINtec® PLUS na detecção de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia cervical de ASC-US.	37
Figura 13 – Curva ROC representativa do desempenho dos testes Cobas 4800® e CINtec® PLUS na detecção de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia cervical de LIEBG.	37
Figura 14 – Curva ROC representativa do desempenho dos testes Cobas 4800® e CINtec® PLUS na detecção de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia cervical de ASC-US acima dos 30 anos de idade.	38
Figura 15 – Curva ROC representativa do desempenho dos testes Cobas 4800® e CINtec® PLUS na detecção de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia cervical de LIEBG acima dos 30 anos de idade.	39
Figura 16 – Curva ROC representativa do desempenho dos testes Cobas 4800® e CINtec® PLUS na detecção de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia cervical de LIEBG com idade menor ou igual a 30 anos.	40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis relacionadas às características sociodemográficas das pacientes submetidas à avaliação colposcópica (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 22
- Tabela 2** – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis relacionadas às características clínico-reprodutivas das pacientes submetidas à avaliação colposcópica (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 23
- Tabela 3** – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis relacionadas ao exame de Papanicolaou das pacientes submetidas à avaliação colposcópica (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 25
- Tabela 4** – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis relacionadas ao exame colposcópico das pacientes convocadas para avaliação complementar (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 26
- Tabela 5** – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis relacionadas ao exame histológico das amostras biopsiadas entre as pacientes submetidas à colposcopia (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 26
- Tabela 6** – Número e porcentagem de pacientes segundo pesquisa para detecção de HPV-AR estratificadas por faixa etária (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 29
- Tabela 7** – Número e porcentagem de pacientes segundo o resultado da pesquisa para detecção de HPV-AR e a avaliação combinada colpo-histológica (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 30
- Tabela 8** – Número e porcentagem de pacientes segundo o resultado da pesquisa para detecção de HPV-AR e a avaliação combinada colpo-histológica agrupadas por faixa etária (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 31
- Tabela 9** – Número e porcentagem de pacientes segundo o resultado do teste de imunocitoquímica (dupla marcação p16/Ki-67) e a avaliação combinada colpo-histológica (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 33

Tabela 10 – Número e porcentagem de pacientes segundo o resultado do teste de ICQ (dupla marcação p16/Ki-67) e a avaliação combinada colpo-histológica agrupadas por faixa etária (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 34

Tabela 11 – Desempenho comparativo dos testes para pesquisa de DNA-HPV e imunocitoquímica no diagnóstico de lesões de alto grau (NICII/III) de acordo com os parâmetros de sensibilidade, especificidade e área sob a curva ROC (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013). 36

LISTA DE ABREVIATURAS

ALTS	<i>ASC-US / LSIL Triage Study</i>
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas
AUC	<i>Area under the curve</i>
CE	Curetagem endocervical
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
Dp	Desvio padrão
E6	Proteína oncogênica do Papilomavírus humano
E7	Proteína oncogênica do Papilomavírus humano
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HC2	Teste de captura híbrida II
HE	Hematoxilina-eosina
HPV	Papilomavírus humano (<i>human papillomavirus</i>)
HPV-AR	Papilomavírus humano de alto risco oncogênico
HPV-BR	Papilomavírus humano de baixo risco oncogênico
ICQ	Imunocitoquímica
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
JEC	Junção escamo-colunar
Ki-67	Antígeno marcador de proliferação celular
LIEAG	Lesão escamosa intraepitelial de alto grau
LIEBG	Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau
LSIL	<i>Low grade squamous intraepithelial lesion</i>
NIC II	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 2
NIC III	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 3

NIC2+	Indica presença de lesão intraepitelial cervical de grau 2 ou mais grave
NIC3+	Indica presença de lesão intraepitelial cervical de grau 3 ou mais grave
OMS	Organização Mundial da Saúde
P16	Proteína supressora de tumor
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRb	Proteína de susceptibilidade do retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
SP	Estado de São Paulo
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
UM	Unidade móvel
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
ZT	Zona de transformação

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
=	Igual a
%	Porcentagem
+	Positivo/superior
®	Marca registrada
β	Beta

RESUMO

Possati-Resende JC. *Detecção de lesão intraepitelial cervical de alto grau em mulheres com citologia de ASC-US e LIEBG: comparação entre a expressão imunocitoquímica dos biomarcadores p16/Ki-67 e teste molecular de DNA-HPV de alto risco. Dissertação (Mestrado)*. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2014.

JUSTIFICATIVA: O câncer do colo do útero constitui importante problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, com altas taxas de incidência e mortalidade. Apesar da inquestionável contribuição dos exames citológicos de Papanicolaou comumente utilizados pelos programas de rastreamento do câncer cervical, estes apresentam grande variação na sua sensibilidade e especificidade em detectar lesões neoplásicas cervicais, com taxas de falso-negativo que podem chegar a 20%. Diante disso, o emprego de biomarcadores e a utilização de testes moleculares para pesquisa de HPV de alto risco constituem auxílios valiosos no incremento da acurácia dos testes de rastreio. **OBJETIVO:** Comparar a acurácia entre a dupla coloração imunocitoquímica (ICQ) pelos biomarcadores p16/Ki-67 e o emprego de teste molecular de DNA-HPV de alto risco na identificação de neoplasias intraepiteliais de alto grau em mulheres com citologia cervical em meio líquido categorizada como ASC-US ou LIEBG. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Realizou-se estudo transversal com coleta prospectiva de dados tendo sido avaliadas 201 mulheres que realizaram citologia cervical para rastreio de câncer cervical no Departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos e que tiveram resultados categorizados como ASC-US (n=96) ou LIEBG (n=105). Todas as pacientes foram submetidas à exame colposcópico com ou sem biópsia cervical para o diagnóstico de possíveis casos de NICII/III. Adicionalmente foram realizadas pesquisa para HPV-AR (teste Cobas 4800®) e imunocitoquímica para detecção combinada dos biomarcadores p16/Ki-67 (teste CINtec® PLUS) sendo a acurácia de cada método avaliada de acordo com a faixa etária e o Papanicolaou de cada paciente. **RESULTADOS:** Entre as mulheres com citologia de ASC-US identificou-se 8,4% de NICII/III com taxas de sensibilidade e especificidade de 87,5% e 79,5% para a pesquisa de HPV-AR e 62,5% e 93,1% para o teste de ICQ respectivamente. Não verificou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,489$) entre as áreas sob a curva ROC de ambos os métodos na detecção de lesões cervicais precursoras nesse grupo. Entre as mulheres com citologia de LIEBG, diagnosticou-se 22,1% de NICII/III (16,3% NICII, 5,8% NICIII) com taxas de sensibilidade e especificidade de 87% e 34,7% para a pesquisa de HPV-AR e 69,6% e 75,3% para a ICQ respectivamente, com desempenho superior da dupla marcação p16/Ki-67 sobretudo entre as mulheres abaixo dos 30 anos onde o teste obteve área sob a curva ROC de 0,762 ($p<0,001$). **CONCLUSÃO:** Ambos os métodos analisados mostraram-se igualmente satisfatórios em predizer a presença de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau entre mulheres com citologia de ASC-US, sobretudo no grupo acima de 30 anos de idade. Entre as mulheres com citologia de LIEBG a dupla marcação p16/Ki-67 conferiu maior acurácia na identificação de lesões precursoras, especialmente NICIII, quando comparado ao teste molecular para HPV de alto risco oncogênico.

PALAVRAS-CHAVE: Colo do útero; Neoplasia Intraepitelial Cervical; Testes de DNA para Papilomavírus Humano; Imunoistoquímica; Antígeno Ki-67; Inibidor p16 de Quinase Ciclina-Dependente.

ABSTRACT

Possati-Resende JC. *Detection of high-grade cervical intraepithelial lesions in women with cytology of ASC-US and LSIL: comparison between immunocytochemistry expression of biomarkers p16/Ki-67 and molecular test of high risk DNA-HPV. Dissertation (Master's degree)*. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2014.

BACKGROUND: The cervical cancer is an important public health problem, especially in developing countries, with high rates of incidence and mortality. Despite the unquestionable contribution of Pap smear commonly used by cervical cancer screening programmes, these tests show great variation in their sensitivity and specificity in detecting cervical neoplastic lesions with false-negative rates that can reach 20%. Therefore, the use of biomarkers and molecular testing for high-risk HPV are important in increasing the accuracy of screening tests. **AIMS:** To compare the accuracy between the double immunocytochemical (ICQ) staining for biomarkers p16 and Ki-67 and the use of molecular testing of high risk HPV DNA in identifying high-grade intraepithelial lesions in women with cervical cytology in liquid based categorized as ASC-US or LSIL. **MATERIAL AND METHODS:** It was conducted a cross-sectional study with prospective data collection of 201 women who underwent cervical cytology screening for cervical cancer in the Department of Cancer Prevention of Barretos Cancer Hospital and their results were categorized as ASC-US (n=96) or LSIL (n=105). All patients underwent colposcopy with or without cervical biopsy for the diagnosis of possible cases of HSIL. In addition it was performed HR-HPV test (Cobas 4800® test) and immunocytochemistry for detection of combined biomarkers p16/Ki-67 (CINtec® PLUS test) with an accuracy of each method evaluated according to age and Pap smear results of each patient. **RESULTS:** Among women with ASC-US cytology it was identified 8.4% of HSIL with sensitivity and specificity rates of 87.5% and 79.5% for the detection of HR-HPV and 62.5% and 93.1% for the test ICQ, respectively. There was not a statistically significant difference ($p=0.489$) between the areas under the ROC curve of both methods in the detection of precursor cervical lesions in this group. Among women with LSIL cytology, it was diagnosed 22.1 % of HSIL (16.3% CINII, CINIII 5.8%) with sensitivity and specificity rates of 87% and 34.7% for the HR-HPV detection and 69.6% and 75.3% for ICQ, respectively, with superior performance of the double marking p16/Ki-67 especially among women under 30 where the test obtained area under the ROC curve of 0.762 ($p<0.001$). **CONCLUSION:** Both methods analyzed were equally satisfactory in predicting the presence of cervical intraepithelial lesion among women with ASC-US cytology, especially in the group under the 30s. Among women with LSIL cytology, the double marking p16/Ki-67 produced a greater accuracy in identifying precursor lesions, especially CINIII, when compared to molecular testing for high-risk oncogenic HPV.

KEYWORDS: Cervix Uteri, Cervical Intraepithelial Neoplasia, Human Papillomavirus DNA Tests, Immunohistochemistry, Ki-67 Antigen, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p16.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero constitui importante problema de saúde pública com impacto mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, com altas taxas de incidência e mortalidade. Representa a terceira neoplasia mais comum entre as mulheres em todo o mundo, e em alguns países com condições socioeconômicas não favoráveis ocupa a segunda posição entre os tipos de cânceres mais incidentes entre a população feminina.

Levantamentos referentes ao ano de 2008 apontaram que, em todo o mundo, são diagnosticados anualmente cerca de 529 mil casos novos de câncer cervical sendo o mesmo responsável pela morte de aproximadamente 275 mil mulheres 88% das quais oriundas de países em desenvolvimento¹.

Estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) apontaram para um número aproximado de 17.540 casos novos de câncer cervical somente para o ano de 2012 entre as mulheres brasileiras, com um risco estimado de 17 casos para cada 100.000 mulheres. Excetuando-se os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o mais incidente entre as mulheres da região Norte do Brasil, o segundo mais incidente nas regiões Nordeste e Centro-Oeste e ocupa ainda a terceira e quarta posições nas regiões Sudeste e Sul respectivamente².

Para o Estado de São Paulo especificamente, o INCA estimou a ocorrência de cerca de 2.880 casos novos de câncer do colo do útero no ano de 2012 com taxa de incidência de 13,24 casos para cada grupo de 100.000 mulheres paulistas².

Nos Estados Unidos as estatísticas oficiais para o ano de 2010 apontaram uma taxa global de incidência de câncer cervical de 7,9 casos para cada 100.000 mulheres com cerca de 12.200 casos novos diagnosticados³, tendo sido demonstradas significativas reduções nas taxas de incidência entre as mulheres americanas ao longo das últimas três décadas⁴.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as regiões do mundo que apresentam as mais elevadas taxas de incidência/mortalidade por câncer cervical são as regiões sul, ocidental e oriental do continente Africano além das porções sul e central do continente Asiático e da América do Sul¹.

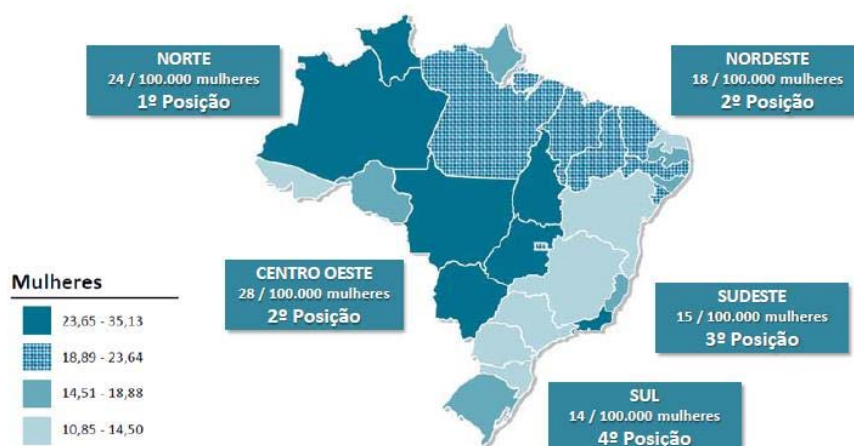


Figura 1 – Representação das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna do colo do útero, por 100 mil mulheres brasileiras, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (**Fonte:** modificado da referência 2).

No Brasil, especificamente, a mortalidade decorrente do câncer cervical tem evidenciado tendência de estabilização ao longo das últimas décadas, entretanto, uma melhora significativa desse parâmetro não tem sido verificada principalmente pelo incremento no número de mortes por câncer do colo do útero nas regiões Norte e Nordeste do país⁵. Dados do Ministério da Saúde, que não raramente apresentam distorções devido a subnotificações e equívocos nos sistemas de informações sobre câncer, revelam taxa global de mortalidade ajustada por idade de 4,6/100 mil mulheres⁶, com pronunciadas discrepâncias regionais.

Esses diferentes cenários de incidência e mortalidade verificados, seja no Brasil ou no restante do mundo, traduzem fundamentalmente a heterogeneidade das condições socioeconômicas das populações, com disparidades acentuadas no acesso à programas de rastreamento de qualidade e adequado manejo das mulheres com testes diagnósticos alterados⁷.

1.2 História natural do câncer do colo do útero

A história natural do desenvolvimento do câncer do colo uterino está intimamente associada à infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) dos tipos carcinogênicos a qual representa a infecção sexualmente transmissível mais prevalente no mundo⁸. Habitualmente a infecção pelo HPV ocorre mais frequentemente entre mulheres jovens, com vida sexual ativa, múltiplos parceiros sexuais e possui pico de incidência poucos anos após o início da atividade sexual⁹.

Extensa revisão publicada em 2010 e baseada em estudos divulgados entre 1995 e 2009 estimou uma prevalência global de 11,7% para a infecção pelo HPV entre mulheres de todas as idades com citologia cervical normal, verificando-se taxas mais elevadas nas regiões da África Subsaariana (24%), Europa Oriental (21,4%) e América Latina (16,1%)¹⁰.

Os dados estatísticos referentes à incidência e prevalência da infecção pelo HPV no Brasil não apresentam representação uniforme das diferentes regiões do país e habitualmente baseiam-se em análises transversais de pacientes com alterações citológicas identificadas em testes de rastreio. Estudo de revisão publicado em 2010 demonstrou prevalência global de infecção pelo HPV variando entre 13,7% e 54,3%. Ao se considerar apenas as mulheres com citologia cervical normal verificou-se taxas de 10,4% a 24,5% de prevalência¹¹.

Recentemente, pesquisa utilizando-se de novo teste molecular para identificação de DNA viral (*Qiagen careHPV® test*) aplicado em 2000 mulheres rastreadas para câncer cervical pelo Hospital de Câncer de Barretos demonstrou 12,3% de positividade para HPV de alto risco oncogênico (HPV-AR) independentemente do resultado do teste de Papanicolaou¹².

Cerca de 40 tipos de HPV são capazes de infectar as células epiteliais do trato genital. De acordo com o genótipo e as alterações celulares induzidas pela incorporação do material genético viral ao genoma da célula hospedeira, aproximadamente 15 tipos de HPV são classificados como de alto risco sendo responsáveis pela quase totalidade dos casos de câncer do colo do útero¹³.

Importa ressaltar o fato de que os mecanismos implicados na carcinogênese do câncer cervical invariavelmente dependem do dano genético causado pelo vírus ao DNA celular e que esse processo se dá de forma lenta e progressiva. Múltiplos fatores associados à

virulência do HPV e à resposta imune do hospedeiro irão determinar o surgimento ou não de lesões teciduais e a gravidade dessas lesões.

Para a maioria das mulheres, sobretudo entre as mais jovens, a infecção pelo HPV rotineiramente apresenta caráter transitório¹⁴ com regressão espontânea em um período que varia de poucas semanas a até 24 meses sem o desenvolvimento de lesões epiteliais significativas. Mesmo entre as mulheres que chegam a desenvolver as chamadas lesões intraepiteliais precursoras (NICII/III), cerca de 26% delas também sofrerão regressão espontânea completa em até 15 semanas após estabelecido o diagnóstico¹⁵.

1.3 Limitações do teste de Papanicolaou no rastreamento do câncer cervical

Os programas de rastreamento do câncer cervical, rotineiramente baseados na realização de testes citológicos (Papanicolaou), foram responsáveis por uma substancial redução do ônus desse tipo de neoplasia nos países desenvolvidos nas últimas décadas¹⁶.

Em grande parte, esses resultados se devem às estratégias de detecção precoce baseadas em programas organizados, com altas taxas de cobertura populacional, avaliação sistemática das mulheres com testes positivos e eficiência no acompanhamento e tratamento das pacientes com lesões precursoras o que impactou positivamente para a redução das taxas de morbimortalidade, sobretudo na Europa, América do Norte, Japão, Austrália e Nova Zelândia¹⁷.

Apesar da inquestionável contribuição dos exames citológicos, estes apresentam grande variação na sua sensibilidade e especificidade em detectar lesões neoplásicas cervicais. Em diversas revisões, a sensibilidade da citologia em diagnosticar lesões de alto grau (LIEAG) variou de 47% a 62%, e a especificidade de 60% a 95%^{18, 19}. Estima-se, ainda, taxas entre 5% e 20% de testes falso-negativos na população geral²⁰, sendo que aproximadamente 30% das pacientes diagnosticadas com câncer cervical apresentaram pelo menos um Papanicolaou anterior com resultado falso-negativo²¹.

Vários são os fatores que podem interferir para a ocorrência não desprezível de resultados falso-negativos nos testes de Papanicolaou estando invariavelmente associados à equívocos na coleta do material com amostragem celular inadequada e consequente não

representação da zona de transformação, problemas relacionados ao preparo das lâminas e sobretudo, aos erros de análise e interpretação do esfregaço cervical.

Além disso, muitas dessas limitações atribuídas ao exame de Papanicolaou estão associadas a critérios de classificação de baixa reprodutibilidade sendo que a maior contribuição à discutível confiabilidade do método se deve às alterações classificadas genericamente como “atípias de significado indeterminado”, cujo grau de imprecisão é significativo e apresenta grande variabilidade, mesmo entre observadores experientes²².

Há consenso em relação ao manejo das mulheres com citologias cervicais classificadas como LIEAG sendo imperioso o encaminhamento para exame complementar de colposcopia e adequado tratamento nos casos com diagnóstico firmado. Entretanto, as citologias com alterações classificadas como “células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas” (ASC-US) ou ainda com lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG) permanecem um desafio do ponto de vista de conduta clínica sendo alvo de inúmeros estudos e diferentes protocolos de seguimento.

Do ponto de vista histológico, 5% a 22% dos exames citológicos que recebem a classificação de ASC-US podem, em verdade, ocultar uma lesão de alto grau (LIEAG)²³⁻²⁵. Recente levantamento publicado por Lapierre SG et al. demonstrou diagnóstico histológico de 7,3% de lesões NICII/III entre mulheres residentes no Canadá com idade ≥ 24 anos e citologia prévia de ASC-US²⁶.

Em relação às mulheres com diagnóstico citológico de LIEBG, alguns estudos mostram que a chance dessas pacientes terem testes histológicos revelando LIEAG varia de 9% a 30%²⁷⁻²⁹.

Se considerarmos que nos Estados Unidos cerca de 2% a 5% dos exames de Papanicolaou apresentarão anormalidades citológicas e que, desse total, 90% ou mais serão diagnosticados como ASC-US ou LIEBG³⁰ estaremos diante de um contingente considerável de mulheres portadoras de LIEAG que serão subdiagnosticadas. Assim, torna-se importante definir estratégias para o manejo desse grupo de pacientes que recebem diagnóstico citológico de ASC-US / LIEBG no intuito de se identificar as mulheres com maior risco de lesões precursoras que exigem ativa intervenção terapêutica.

1.4 Contribuição do teste de DNA-HPV no rastreamento do câncer cervical

Diferentes estudos de base populacional que avaliam o papel dos testes para detecção dos HPV de alto risco no rastreamento primário do câncer cervical têm demonstrado aumento significativo da sensibilidade quando comparados à utilização da citologia de esfregaço cervical, além de serem superiores em termos de reprodutibilidade³¹. Contudo, apesar das vantagens demonstradas, limitações relacionadas a especificidade dos testes para pesquisa de HPV-AR³², sobretudo em mulheres abaixo dos 30 anos, contribuem para elevação no número de pacientes encaminhadas para colposcopia e de biópsias desnecessárias.

O teste de detecção do Papilomavírus humano de alto risco oncogênico tem sido empregado mais frequentemente na triagem de mulheres com exames citológicos classificados como ASC-US em vários países, sobretudo na América do Norte³³ e Europa onde os protocolos de rastreamento indicam sua realização em amostras residuais da citologia em meio líquido. O *ASC-US / LSIL Triage Study (ALTS)* demonstrou que mulheres com resultados de ASC-US e teste negativo para HPV-AR apresentam risco muito baixo para LIEAG³⁴.

Vários testes podem ser utilizados para a pesquisa do HPV-AR na triagem de mulheres com colpocitologia de ASC-US, sendo o teste de captura híbrida II (HC2) (*Qiagen, Gaithersburg, MD, EUA*) o mais rotineiramente utilizado, baseando-se em sondas específicas de RNA para 13 diferentes genótipos de HPV de alto risco oncogênico e 5 genótipos de baixo risco. O resultado da HC2 sinaliza a amostra analisada como positiva ou negativa e indica se o tipo viral pertence ao grupo dos HPV-AR ou HPV-BR, não detalhando o genótipo viral específico.

Mais recentemente, novos testes têm sido apresentados como instrumentos de pesquisa molecular para detecção de DNA-HPV em amostras cervicais com indicação para programas de rastreamento e manejo clínico de pacientes com exames citológicos alterados.

Dentre eles, o *Cobas 4800 test® (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada)* que possibilita a detecção de 14 genótipos de HPV de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) tem sido alvo de investigações que buscam validar sua utilização para a triagem de mulheres com Papanicolaou alterado e no rastreamento primário do

câncer cervical. Ressalta-se, em relação ao Cobas 4800®, potencial vantagem por identificar separadamente os genótipos HPV-16 e HPV-18 os quais, segundo diversos levantamentos, estão associados a cerca de 70% dos casos de neoplasias cervicais invasivas³⁵. Casuística publicada em 2013 identificou a presença de HPV-16 e/ou HPV-18 em 90% dos casos de câncer cervical entre mulheres brasileiras atendidas em dois grandes centros de referência, o que reafirma a importância do papel desses subtipos virais no mecanismo de carcinogênese³⁶.

Estudos comparando o desempenho do teste de captura híbrida II (HC2) com o teste Cobas 4800® não têm evidenciado diferenças significativas na acurácia de ambos os métodos^{24, 26, 37-39}. Lapiere et al. demonstraram taxas de sensibilidade e especificidade de 89,7% e 66,7%, respectivamente para o Cobas 4800® e de 93,1% e 72,2% para a HC2 na identificação de mulheres com lesões NIC2+²⁶.

White C et al. verificaram índices semelhantes no emprego do Cobas 4800® para a detecção de lesões NIC2+ em mulheres com citologia de ASC-US com taxas de sensibilidade e especificidade de 81% e 63,3% respectivamente. Adicionalmente, nesse mesmo trabalho evidenciou-se 86% de sensibilidade e 55,2% de especificidade na detecção de lesões NIC2+ em mulheres com Papanicolaou categorizado com LIEBG³⁷.

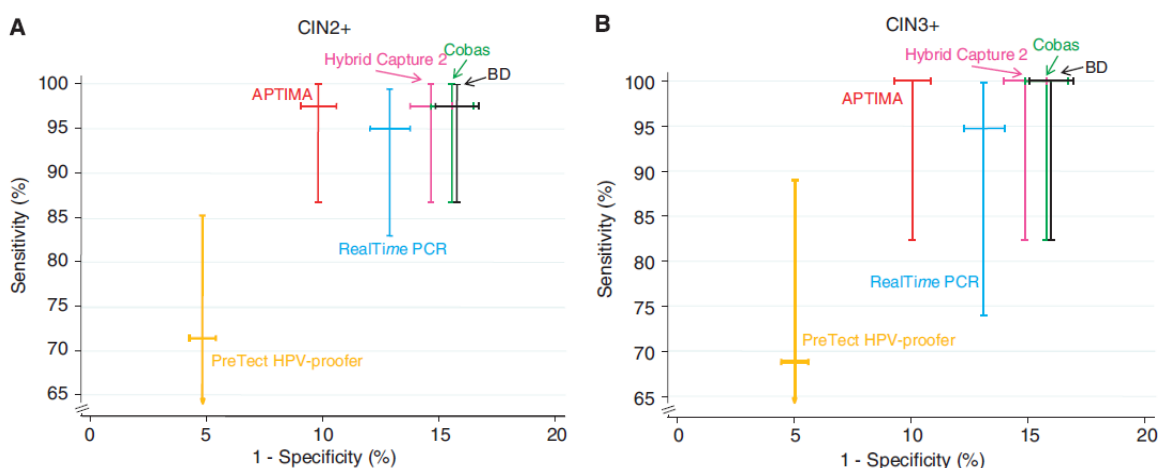


Figura 2 – (A) Sensibilidade e especificidade de seis diferentes testes de HPV para detecção de lesões NIC2+ em amostras de citologia em meio líquido. (B) Sensibilidade e especificidade de seis diferentes testes de HPV para detecção de lesões NIC3+ em amostras de citologia em meio líquido (**Fonte:** extraído da referência 32).

Um recente estudo avaliou o desempenho do Cobas 4800® na detecção de NIC2+ comparado à outros cinco testes empregados na pesquisa de DNA ou RNA viral em amostras de citologia em meio líquido. Conforme verifica-se na figura 2, comparativamente aos demais testes, o Cobas 4800® forneceu altas taxas de sensibilidade e especificidade³².

1.5 Emprego de biomarcadores moleculares na detecção de lesões intraepiteliais do colo uterino

Frente às limitações de especificidade no emprego dos testes de DNA-HPV para citologias com achados menores, a descoberta de marcadores biológicos que forneçam uma sensibilidade semelhante à dos testes de HPV, mas com especificidade significativamente maior tem sido alvo de inúmeros estudos.

O emprego de biomarcadores contribui especialmente para fornecer evidências da persistência da infecção pelo HPV e da ativação de suas proteínas oncogênicas virais, sobretudo E6 e E7, apontando para uma elevação do risco de desenvolvimento de lesões epiteliais cervicais clinicamente relevantes (neoplasia intraepitelial cervical de alto grau ou carcinoma invasor).

Adicionalmente, a utilização dos biomarcadores confere potencial aperfeiçoamento na conduta e triagem de mulheres com resultados de ASC-US além de reduzir as taxas de encaminhamento para avaliação colposcópica das pacientes com diagnóstico citológico de LIEBG.

Nos últimos anos, vários marcadores têm sido apresentados como possíveis candidatos para a triagem eficiente de exames citológicos de ASC-US ou LIEBG, dentre eles destacam-se a proteína supressora de tumor p16^{INK4a} (p16) e o marcador de proliferação celular Ki-67.

1.5.1 Utilização dos biomarcadores p16^{INK4a} e Ki-67

A proteína de supressão tumoral p16 tem sido largamente utilizada em estudos que revelam sua superexpressão em amostras de lesões precursoras ou francamente invasivas

do colo do útero positivas para HPV de alto risco. Esse aumento na expressão de p16, em verdade, se deve a inativação da proteína do retinoblastoma (pRb) pela oncoproteína viral E7 o que acarreta a perda do efeito inibitório de pRb sobre a transcrição do gene INK4a (responsável pela codificação da p16) e da ativação na transcrição desse gene por E2F. Embora aparentemente paradoxal, a superexpressão da proteína supressora tumoral p16 associa-se com o potencial oncogênico da infecção pelo HPV, uma vez que sua função está seriamente comprometida pela inativação de pRb⁴⁰.

A imunomarcação da p16 pode ser demonstrada através de testes em amostras citológicas ou histológicas o que possibilita seu emprego tanto em protocolos de rastreio e triagem de casos duvidosos como no seguimento de pacientes já previamente tratadas. Contudo, sua ampla aplicação na prática clínica ainda carece de adequada padronização e estabelecimento de valores limites para caracterizar a positividade de determinada amostra, sobretudo entre os espécimes citológicos⁴¹.

O emprego de testes de imunocitoquímica para coloração do p16 tem evidenciado em vários estudos altas taxas de positividade principalmente para espécimes com diagnóstico citológico de lesão intraepitelial de alto grau. Em estudo utilizando-se de amostras celulares residuais de citologia em meio líquido (SurePath[®]), Saqi et al. encontraram 90% de positividade para marcação do p16 em espécimes com diagnóstico de LIEAG⁴².

Ki-67 é uma proteína nuclear humana presente em todas as fases do ciclo celular, exceto G0, comumente utilizada como marcador de proliferação celular em vários tumores, inclusive para o câncer cervical e que está precocemente expressa em lesões intraepiteliais constituindo importante fator preditor de progressão⁴³. Evidências apontam uma maior expressão do Ki-67 paralelamente à gravidade das lesões intraepiteliais cervicais⁴⁴, contudo, isoladamente, não parece determinar fator prognóstico⁴⁵.

A dupla coloração imunocitoquímica dos biomarcadores p16 + Ki-67 têm-se mostrado promissora com satisfatórias taxas de sensibilidade semelhantes os testes para pesquisa de HPV e especificidade superiores na detecção de lesões intraepiteliais de alto grau. Ainda poucos estudos foram publicados, porém, a dupla marcação das proteínas p16/Ki-67 tem demonstrado vantagens na utilização tanto no rastreio primário quanto no manejo de citologias com atipias mínimas.

Schmidt et al., utilizando a dupla marcação, demonstraram sensibilidade e especificidade de 92,2% e 80,6% respectivamente na identificação de lesões NIC2+ em mulheres com ASC-US no teste de Papanicolaou e 94,2% e 68% para o grupo com diagnóstico prévio de LIEBG pelo exame citológico⁴⁶.

Estudos têm evidenciado incremento das taxas de positividade dos testes de dupla marcação p16/Ki-67 diretamente associado a severidade da lesão histológica. Wentzensen N et al., utilizando o CINtec® PLUS (*Roche mtm laboratories AG*) identificaram taxas de 26,8% de positividade em espécimes histológicos normais, 46,5% em pacientes com biópsias de NICI, 82,8% em NICII e 92,8% em NICIII, adicionalmente, demonstrou ainda, índices de sensibilidade e especificidade para a dupla coloração de 97,2% e 60% respectivamente entre mulheres com idade igual ou superior a 30 anos na detecção de lesões NIC3+⁴⁷.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo comparar a acurácia entre a dupla coloração imunocitoquímica pelos biomarcadores p16 e Ki-67 e o emprego de teste molecular de DNA-HPV de alto risco na identificação de lesões intraepiteliais de alto grau em mulheres com citologia cervical em meio líquido categorizada como atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) ou lesão intraepitelial cervical de baixo grau (LIEBG).

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Foi realizado estudo transversal com coleta de dados prospectiva, desenvolvido nos Departamentos de Prevenção e Anatomia Patológica do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) – Fundação Pio XII, Barretos – SP.

3.2 População do estudo

Foram incluídas no estudo mulheres com idade superior a 18 anos que submeteram-se a exame de Papanicolaou para rastreamento de câncer cervical através do método de citologia em meio líquido (*SurePath*[®] - *Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ*) no período de (fevereiro/2012 a julho/2013) e cujos resultados foram categorizados como lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG) ou como atipias de células escamosas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica (ASC-US) de acordo com os critérios estabelecidos pela revisão do Sistema Bethesda em 2001⁴⁸.

Os critérios estabelecidos para a inclusão das pacientes no estudo foram:

- 1) Comparecimento ao Departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos para realização de avaliação colposcópica após convocação;
- 2) Assinatura do Termo de Consentimento depois de prestados os devidos esclarecimentos.

Os critérios estabelecidos para a exclusão das pacientes no estudo foram:

- 1) Pacientes submetidas à cirurgia prévia de histerectomia com extirpação do colo uterino;

3.3 Metodologia

As pacientes elegíveis para o estudo foram selecionadas entre as mulheres que realizaram exame de colpocitologia oncótica em base líquida ofertada pelo serviço de rastreamento do Hospital de Câncer de Barretos, tanto aquelas que realizaram o teste pelas Unidades Móveis (UM) de Prevenção quanto às que foram atendidas no próprio Departamento de Prevenção do HCB.

Procedeu-se a convocação das pacientes para realização de exame colposcópico no Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior do Departamento de Prevenção do HCB através de busca ativa utilizando-se de correspondências eletrônica, escrita e contato telefônico (obedecendo-se os protocolos e estratégias já rotineiramente utilizadas no Departamento de Prevenção).

Previamente à avaliação colposcópica e após o esclarecimento dos objetivos e possíveis dúvidas do estudo, foi obtido Consentimento Livre e Esclarecido por escrito de cada paciente que consentiu em participar da pesquisa (Anexo A).

Foram obtidas ainda, informações específicas sobre dados sociodemográficos, clínico-reprodutivos, hábitos e condições de vida das pacientes através da aplicação de questionário padronizado desenvolvido especificamente para o estudo em questão (Anexo B).

A classificação da avaliação colposcópica baseou-se na nomenclatura estipulada pela *International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy* – Rio de Janeiro, 2011⁴⁹. Nos casos com junção escamo-colunar (JEC) visível, a colposcopia foi considerada adequada (satisfatória) e possíveis lesões epiteliais aparentes foram submetidas a avaliação histológica através de amostras obtidas por biópsias com pinça saca-bocado (um ou mais fragmentos) ou ainda através de curetagem endocervical (CE) nos casos com alterações visíveis que atingissem ou penetrassem o canal cervical.

No grupo de pacientes com JEC não visível ou parcialmente visível a colposcopia foi considerada inadequada (insatisfatória) sendo imperiosa a realização de curetagem endocervical nos casos em que não se identificassem lesões epiteliais na região da ectocérvice. A obtenção de biópsia do canal endocervical foi realizada utilizando-se instrumental adequado (cureta endocervical “Kevorkian”) orientando-se como padrão a

realização de coleta às 3,6,9 e 12 horas (considerando-se como referência as posições do relógio).

Em casos de avaliação colposcópica adequada (satisfatória) sem alterações sugestivas de lesão intraepitelial aparente, não foi realizada biópsia cervical sendo a colposcopia considerada negativa e a paciente normal.

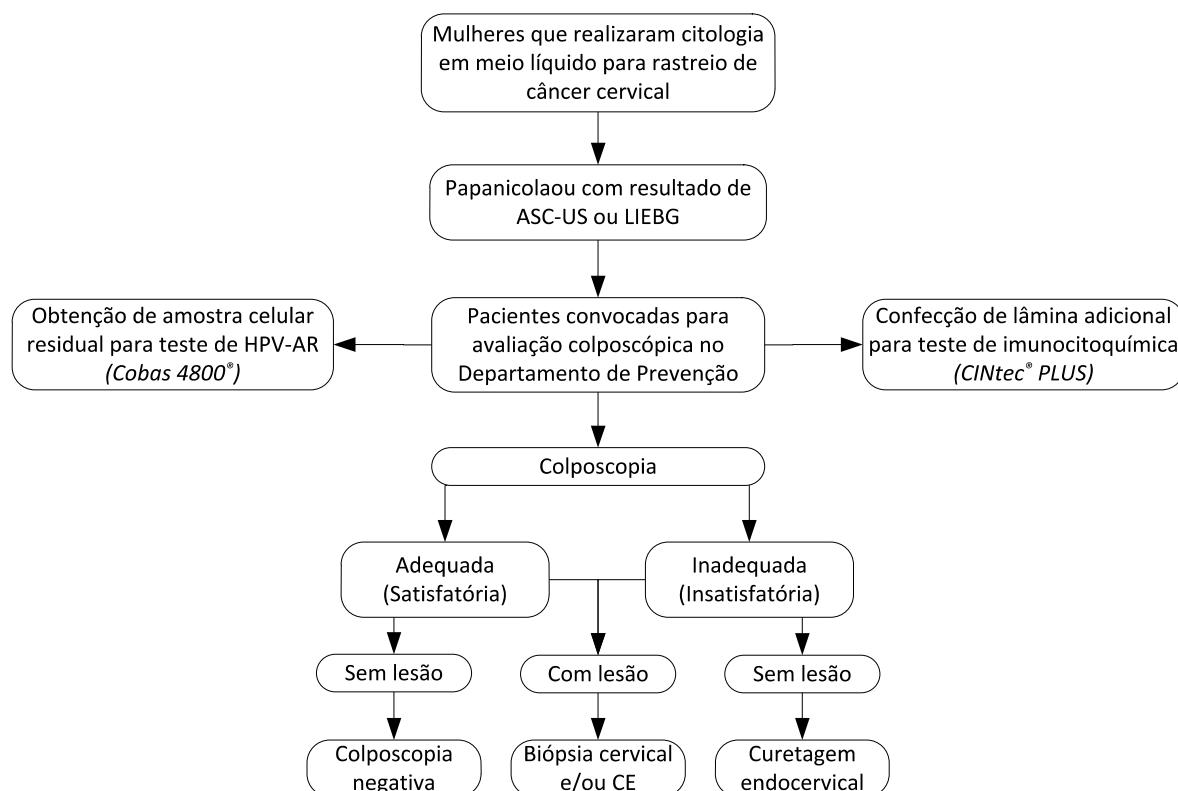


Figura 3 – Fluxograma demonstrativo da metodologia utilizada na avaliação colposcópica das pacientes e realização dos testes para detecção de lesão intraepitelial de alto grau

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas
LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau
CE: curetagem endocervical

As amostras teciduais obtidas através de biópsia cervical e/ou curetagem endocervical durante o exame colposcópico no Departamento de Prevenção foram enviadas para análise pelo Departamento de Anatomia Patológica do HCB, através de coloração hematoxilina-eosina (HE). A avaliação histológica foi realizada separadamente por dois experientes médicos patologistas que permaneceram cegos para os resultados dos testes de HPV e

imunocitoquímica. Os casos discordantes foram revistos buscando-se consenso na classificação morfológica e quando necessário realizou-se análise adicional com teste de imunocitoquímica para marcação da proteína p16^{INK4a} que comprovadamente fornece incremento na acurácia do diagnóstico de lesões intraepiteliais cervicais⁵⁰. A avaliação combinada dos achados colposcópicos e histológicos foi considerada o padrão-ouro para os cálculos de acurácia dos métodos em análise.

Para cada paciente que foi submetida à avaliação colposcópica com ou sem biópsia cervical foi obtida amostra celular residual através do frasco da citologia em meio líquido para pesquisa de HPV-AR e confecção de lâmina adicional para realização de testes de imunocitoquímica. Os exames de ICQ também foram analisados por dois diferentes avaliadores que desconheciam os resultados dos testes de HPV e histopatológicos.

A conduta clínica para seguimento e tratamento das pacientes participantes do estudo foi adotada de acordo com o resultado da análise histopatológica dos espécimes biopsiados e da avaliação colposcópica baseando-se nos Protocolos de Atendimento dos Departamentos de Prevenção e Ginecologia Oncológica do Hospital de Câncer de Barretos em sintonia com as diretrizes ditadas pelo Ministério da Saúde do Brasil⁵¹.

3.3.1 Coloração imunocitoquímica combinada de p16^{INK4a} + Ki-67

Após a preparação da nova lâmina no aparelho *Prepstain BD*[®], a mesma foi submetida à reidratação e recuperação antigênica para posterior realização de testes de imunocitoquímica através da utilização do *CINtec PLUS Cytology*[®] (*Roche MTM Laboratories AG*) segundo as instruções do fabricante. O *CINtec*[®] *PLUS* permite determinar qualitativamente e de maneira simultânea a presença das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67 em amostras de citologia cervical.

Seguida da reidratação as lâminas foram imediatamente fixadas em álcool 99% por 10 minutos a 1 hora e secas, expostas ao ar, de 20 minutos a 16 horas. As reações foram realizadas no *autostainer Dako Autostainer Link* (*Dako, Glostrup, Denmark*), utilizando-se dois kits de revelação, um com diaminobenzidina e outro com fosfatase alcalina. A reação de imunocitoquímica pelo *CINtec*[®] *PLUS* se dá pela ação de um coquetel de anticorpos primários constituído pelo anticorpo monoclonal de camundongo (clone E6H4TM) contra a

proteína p16^{INK4a} humana e o anticorpo monoclonal de coelho (clone 274-11 AC3) contra a proteína humana Ki-67. O anticorpo p16 é marcado com diaminobenzidina que resulta em uma coloração marrom/acastanhada que pode ser nuclear e/ou citoplasmática e o anticorpo ki-67 é marcado com fosfatase alcalina que resulta numa coloração rósea/avermelhada nuclear.

As lâminas foram analisadas por dois médicos do Hospital de Câncer de Barretos, obedecendo-se os critérios previamente definidos pelo fabricante. Lâminas mostrando simultaneamente uma ou mais células epiteliais cervicais com imuno-coloração citoplasmática marrom (p16) e imuno-coloração nuclear vermelha (Ki-67), foram interpretadas como resultado positivo, independentemente da avaliação morfológica (Figura 4). As amostras que não apresentaram nenhuma célula com imunorreatividade dupla foram consideradas negativas⁴⁶.

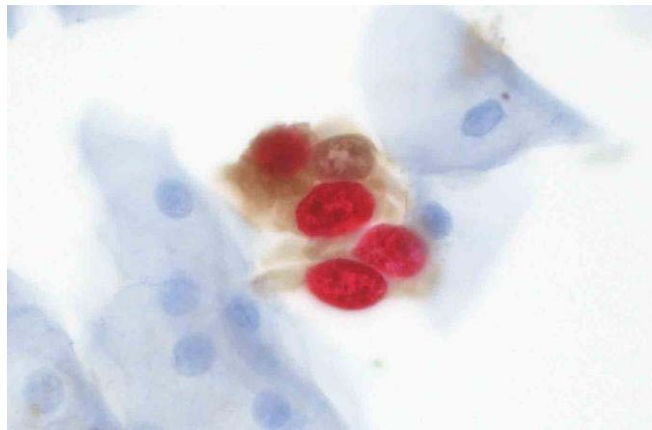


Figura 4 – Exemplo de resultado positivo para o teste de imunocitoquímica demonstrando a dupla coloração celular núcleo/citoplasma (Ki-67/p16)⁵² (Fonte: referência 52)

3.3.2 Detecção qualitativa de HPV de alto risco oncogênico

Foi realizado teste *in vitro* para a detecção do HPV de alto risco oncogênico através da combinação de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e hibridização de ácidos nucléicos numa única análise utilizando-se o *Cobas HPV test*[®] (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), que está disponível no parque tecnológico do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos.

O *Cobas HPV test*[®] possibilita a detecção de 14 genótipos de HPV de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), podendo processar até 94 amostras simultâneas. O DNA foi extraído por meio de um processo de preparação de amostra totalmente automatizado usando o instrumento Cobas x480 e as amostras foram então transferidas para um analisador Cobas z480 para a amplificação do DNA de HPV de alto risco por PCR (de acordo com as instruções do fabricante).

Pares de *primers* complementares foram utilizados para amplificar a região L1 altamente conservada do genoma de HPV, e sondas oligonucleotídicas fluorescentes específicas para HPV16, HPV18, e para os 12 outros tipos de HPV de alto risco, permitindo a detecção em tempo real dos 12 genótipos de HPV de alto risco e, ainda, a detecção individual de HPV16 e HPV18, em uma amostra.

A detecção do gene da β -globina humana foi realizada na mesma alíquota para fornecer uma medida da adequabilidade da amostra e da qualidade de extração e da amplificação (controle interno). Os controles positivos e negativos foram incluídos em cada série. A interpretação da etapa de amplificação e de detecção foi realizada usando software fornecido com a plataforma Cobas 4800.

3.4 Definições das variáveis do estudo

- A) **Acurácia da detecção combinada dos marcadores p16 + Ki-67:** positividade do teste de imunocitoquímica em amostras de citologia cervical categorizadas como ASC-US e LIEBG, porém, pertencentes a mulheres diagnosticadas como portadoras de NICII/III através de exame histopatológico.

- B) **Correlação dos achados colposcópicos e anatomopatológicos com os resultados dos testes de imunocitoquímica e pesquisa para HPV-AR:** verificou-se a correlação entre os achados colposcópicos associados a análise histológica das amostras biopsiadas e os resultados encontrados pelos testes de imunocitoquímica (p16 + ki-67) e teste para HPV-AR (*Cobas HPV test*[®]).

3.5 Análise estatística

Utilizou-se os pacotes estatísticos *Statistical Package for Social Science* for Windows – SPSS (versão 21.0) e *Stata/SE 13.0* for Windows para armazenamento e análise estatística dos dados coletados, levando-se em consideração em todos os testes um nível de significância de 5%.

Para as variáveis sócio-demográficas e clínico-reprodutivas foram calculadas as frequências e porcentagens para as variáveis qualitativas e valores de média, mediana e desvio padrão para as variáveis quantitativas.

Os resultados dos testes para pesquisa de DNA-HPV e ICQ foram avaliados por meio de estatística descritiva para análise de acurácia mensurada por meio da sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos levando-se em consideração a associação entre a avaliação colposcópica e os resultados das biópsias cervicais como padrão-ouro, através do teste qui-quadrado.

Calculou-se os respectivos intervalos de confiança (95%) dos indicadores de acurácia, sendo o desempenho dos testes diagnósticos em prever a presença de lesão intraepitelial de alto grau avaliado através de delineamento de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). As Áreas sob a Curva (AUC – *Area Under the Curve*) foram comparadas entre si utilizando-se o teste qui-quadrado e dividindo-se a população de estudo de acordo com o resultado do Papanicolaou inicial e a faixa etária das mulheres participantes.

3.6 Aspectos éticos

Por se tratar de estudo com coleta prospectiva dos exames, foi elaborado termo de consentimento pós-informado o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos, parecer nº 108.191/2012 (Anexo C).

Todas as informações que pudessem identificar os sujeitos da pesquisa foram mantidas em sigilo e codificadas no banco de dados para garantir a confidencialidade dos dados e a privacidade dos participantes.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Descrição da população

4.1.1 Descrição das características sociodemográficas

A casuística foi composta por 201 mulheres, com idade variando de 18 a 76 anos (média=39,2 anos; dp=14,0 anos; mediana=39,0 anos) sendo a maioria brancas (47,3%) ou pardas (35,8%) residentes nas cidades de Barretos – SP (34,8%) e Bebedouro – SP (25,4%). Em relação ao estado civil, 50,2% das mulheres intitularam-se casadas ou participantes de união estável e 34,8% declararam-se solteiras. Verificou-se, em relação ao grau de instrução escolar, que a maioria das mulheres apresentavam escolaridade até o ensino fundamental (46,2%) [Tabela 1].

Tabela 1 – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis relacionadas às características sociodemográficas das pacientes submetidas à avaliação colposcópica (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>n (*)</i>	<i>(%)</i>
<i>Cor da pele</i>	<i>Branca</i>	95	(47,3)
	<i>Parda</i>	72	(35,8)
	<i>Negra</i>	34	(16,9)
<i>Estado civil</i>	<i>Solteira</i>	70	(34,8)
	<i>Casada/União estável</i>	101	(50,2)
	<i>Separada/Divorciada</i>	17	(8,5)
	<i>Viúva</i>	13	(6,5)
<i>Escolaridade</i>	<i>Analfabeta</i>	5	(2,5)
	<i>Ensino fundamental</i>	93	(46,2)
	<i>Ensino médio</i>	73	(36,4)
	<i>Ensino superior</i>	30	(14,9)

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise

4.1.2 Descrição das características clínico-reprodutivas

Aproximadamente três quartos das mulheres encontravam-se no período da menacme (74,5%), sendo que 78,1% referiu gestação prévia, dentre as quais 68,2% com histórico de duas ou mais gestações. O número médio de gestações foi 2,2 (dp=2,0; mediana=2,0) e 14,4% das mulheres relataram pelo menos um aborto anterior.

Tabela 2 – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis relacionadas às características clínico-reprodutivas das pacientes submetidas à avaliação colposcópica (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>n (*)</i>	<i>(%)</i>
Menopausa	<i>Não</i>	146	(74,5)
	<i>Sim</i>	50	(25,5)
Gestação prévia	<i>Não</i>	44	(21,9)
	<i>Sim</i>	157	(78,1)
Nº de gestações prévias	<i>1</i>	32	(20,4)
	<i>2</i>	55	(35,0)
	<i>3</i>	33	(21,0)
	<i>≥4</i>	37	(23,6)
Abortos prévios	<i>Não</i>	172	(85,6)
	<i>Sim</i>	29	(14,4)
Menarca	<i>Até 13 anos</i>	139	(69,2)
	<i>Mais de 13 anos</i>	62	(30,8)
Sexarca	<i>Até 17 anos</i>	115	(57,2)
	<i>Mais de 17 anos</i>	86	(42,8)
Nº de parceiros sexuais	<i>1</i>	64	(32,2)
	<i>2-3</i>	68	(34,2)
	<i>>3</i>	67	(33,6)

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

A idade da menarca variou de 8 a 18 anos (média=12,6 anos; dp=1,7 anos; mediana=13,0 anos), já para a sexarca demonstrou-se idade média de 17,9 anos com variação de 12 a 46 anos (dp=4,6 anos, mediana=17,0 anos). Apenas um parceiro sexual durante toda a vida foi declarado por 32,2% das mulheres, 34,2% declararam 2 ou 3 parceiros sexuais e 33,6% informaram mais de 3 parceiros sexuais durante a vida [Tabela 2].

À consulta ambulatorial, 91,5% das pacientes estavam assintomáticas sendo a dispareunia e o corrimento vaginal as queixas clínicas relatadas por 4% e 3,5% das mulheres respectivamente.

4.1.3 Descrição dos exames de citologia cervical (Papanicolaou)

Os exames de Papanicolaou que elegeram as pacientes à participarem do estudo foram coletados no período de fevereiro/2012 a julho/2013 sendo 61,7% provenientes de mulheres atendidas pelas Unidades Móveis (UM) de Prevenção do HCB e 38,3% oriundos de coletas realizadas nas instalações do Departamento de Prevenção do HCB.

Do total de 201 exames de esfregaço cervical que compuseram a casuística do estudo, 96 foram categorizados como ASC-US e 105 como LIEBG. Na avaliação dos epitélios cervicais presentes nas amostras citológicas analisadas observou-se que 79,1% dos espécimes apresentavam representação de células endocervicais glandulares e/ou metaplásicas.

Considerando-se o histórico de exames de Papanicolaou prévio das pacientes, o exame que elegeu a mulher a participar do estudo foi o primeiro realizado para 10% das mulheres. Para o grupo de mulheres que já havia realizado citologia cervical anteriormente, o intervalo de tempo entre o Papanicolaou atual e o último exame variou de 6 a 144 meses (média=22,6 meses; dp=20,3 meses; mediana=12 meses) [Tabela 3].

Tabela 3 – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis relacionadas ao exame de Papanicolaou das pacientes submetidas à avaliação colposcópica (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

Variável	Categoria	n (*)	(%)
Local de coleta dos exames	<i>UM Prevenção</i>	124	(61,7)
	<i>Departamento Prevenção</i>	77	(38,3)
Laudo citológico	<i>ASC-US</i>	96	(47,8)
	<i>LIEBG</i>	105	(52,2)
Epitélios cervicais representados	<i>Somente escamoso</i>	42	(20,9)
	<i>Escamoso + glandular</i>	111	(55,2)
	<i>Escamoso + metaplásico</i>	3	(1,5)
	<i>Escamoso + glandular + metaplásico</i>	45	(22,4)
Papanicolaou anterior	<i>Não</i>	20	(10,0)
	<i>Sim</i>	180	(90,0)

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

UM: Unidade Móvel de Prevenção

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau

4.1.4 Descrição dos achados colposcópicos e histopatológicos

As pacientes com Papanicolaou alterado que preenchem os critérios de inclusão no estudo foram convocadas para exame colposcópico logo após a conclusão do laudo citológico tendo sido realizados entre fevereiro de 2012 e agosto de 2013. O tempo entre a coleta do exame de esfregaço cervical e a colposcopia variou de 23 a 80 dias com média de 46,9 dias (dp=11,9; mediana=46,0).

O exame colposcópico foi considerado adequado (satisfatório) com completa visualização da junção escamo-colunar em 84,1% das pacientes. Para a maioria dos exames realizados os achados colposcópicos foram classificados como alterações benignas e/ou inflamatórias ou sugestivos de LIEBG com taxas de 46,8% e 43,8% respectivamente [Tabela 4].

Tabela 4 – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis relacionadas ao exame colposcópico das pacientes convocadas para avaliação complementar (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

Variável	Categoria	n (*)	(%)
Classificação conforme a visualização da JEC (**)	<i>Colposcopia adequada (satisfatória)</i>	169	(84,1)
	<i>Colposcopia inadequada (insatisfatória)</i>	32	(15,9)
Achados colposcópicos	<i>Alterações benignas/inflamatórias</i>	94	(46,8)
	<i>Sugestivos de LIEBG</i>	88	(43,8)
	<i>Sugestivos de LIEAG</i>	17	(8,5)
	<i>Não foi possível avaliar</i>	2	(1,0)

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(**) De acordo com a classificação da International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy

JEC: Junção escamo-colunar

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau

LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau

Foram obtidas amostras teciduais (um ou mais fragmentos) através de biópsia cervical, utilizando-se pinça saca-bocado ou cureta endocervical, de 151 pacientes (75,1%) cujos resultados histológicos estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis relacionadas ao exame histológico das amostras biopsiadas entre as pacientes submetidas à colposcopia (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

Variável	Categoria	n (*)	(%)
Biópsia cervical	<i>Não</i>	50	(24,9)
	<i>Sim</i>	151	(75,1)
Laudos histológico	<i>Negativo para neoplasia</i>	47	(31,1)
	<i>NIC I</i>	71	(47,0)
	<i>NIC II</i>	22	(14,6)
	<i>NIC III</i>	9	(6,0)
	<i>Inconclusivo</i>	2	(1,3)

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

NIC I, II, III: Neoplasia intraepitelial cervical graus I, II e III

Duas pacientes apresentaram laudo histológico inconclusivo após a análise dos espécimes coletados, em ambos os casos foram visualizadas alterações focais discretas sugestivas, porém não conclusivas, de efeito citopático viral. Essas pacientes foram posteriormente reavaliadas tendo sido afastada a possibilidade de diagnóstico de lesão cervical relevante após nova colposcopia.

Levando-se em consideração a análise combinada dos achados colposcópicos e histopatológicos a porcentagem de pacientes que apresentaram diagnóstico de LIEAG (NICII/III) foi de 8,4% no grupo com citologia cervical de ASC-US e 22,1% entre as mulheres com Papanicolaou categorizado como LIEBG [Figura 5].

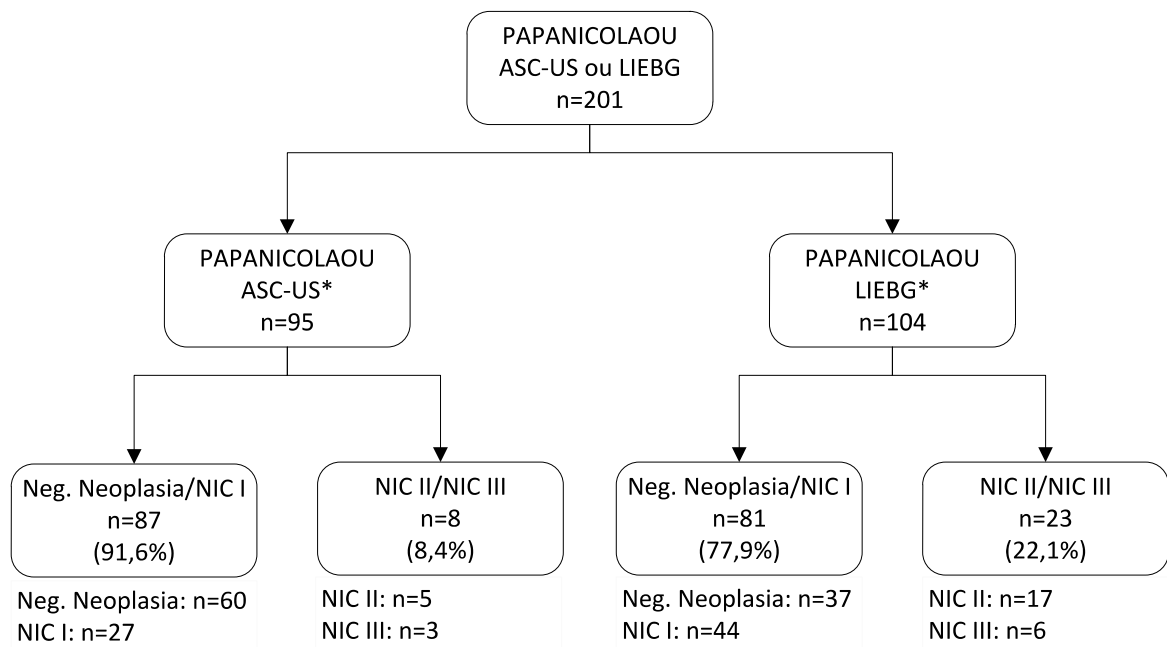


Figura 5 – Número e porcentagem de pacientes segundo o resultado da avaliação colpo-histológica e a citologia cervical (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

(*) Foram excluídos da análise os 2 casos com biópsias inconclusivas (1 para ASC-US e 1 para LIEBG)

NIC I, II, III: neoplasia intraepitelial cervical graus I, II e III

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau

O diagnóstico de lesões precursoras (NICII/III), quando se divide a população do estudo por faixa etária, foi mais frequente entre as mulheres com idade ≤ 30 anos e citologia cervical de LIEBG chegando a 31,9% dos casos (25,0% de NICII e 6,9% de NICIII) ao passo que entre as mulheres com idade acima dos 30 anos e mesmo laudo no Papanicolaou o índice de LIEAG foi de 15% (10% para NICII e 5% para NICIII). Entre as mulheres com citologia de ASC-

US, o grupo mais jovem apresentou taxa semelhante de diagnóstico de NICII/III com 8,6% (4,3% para NICII e NICIII) quando comparado às mulheres com mais de 30 anos que foram diagnosticadas com LIEAG em 8,3% dos casos (5,5% para NICII e 2,8% para NICIII) [Figura 6].

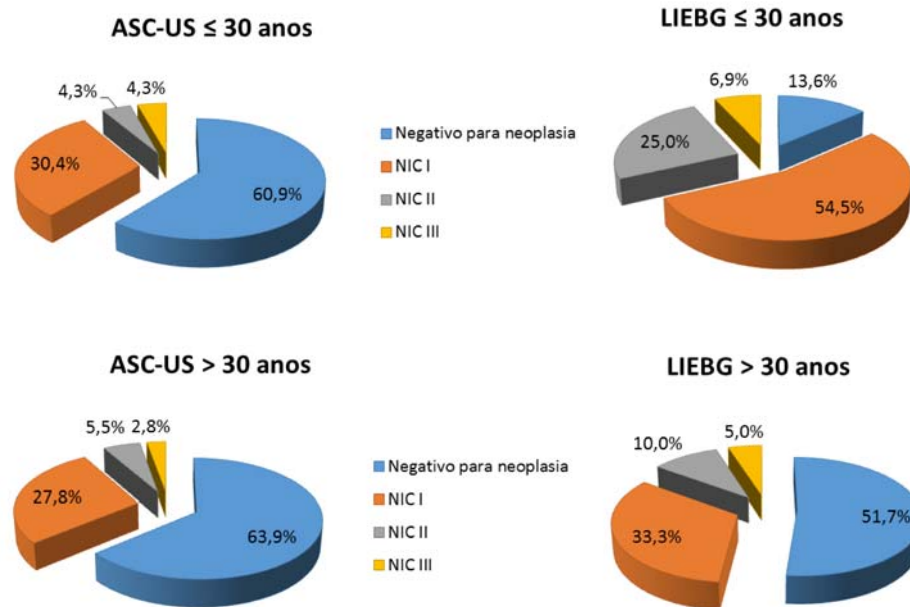


Figura 6 – Representação gráfica da percentagem de pacientes segundo o resultado da avaliação colpo-histológica de acordo com o teste de Papanicolaou inicial (estratificadas por faixa etária).

NIC I, II, III: neoplasia intraepitelial cervical graus I, II e III

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau

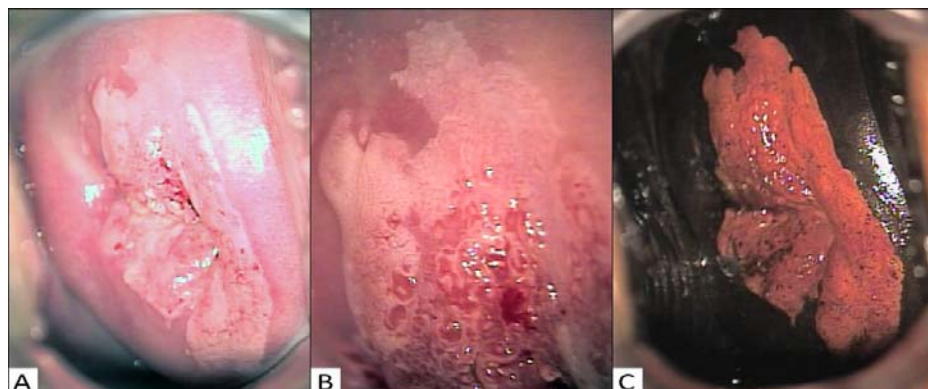


Figura 7 – Exemplo de avaliação colposcópica com presença de achados maiores sugestivos de lesão intraepitelial de alto grau em paciente com Papanicolaou de LIEBG. (A e B) Aspecto colposcópico após aplicação de solução de ácido acético a 5%. (C) Imagem da lesão cervical após aplicação de solução de lugol a 5%.

4.2 Resultados dos testes para detecção de HPV de alto risco oncogênico

A pesquisa para detecção de HPV de alto risco oncogênico nas amostras de citologia em meio líquido através do teste Cobas 4800® evidenciou taxa global de positividade de 49,2%, sendo que do total de 201 amostras testadas não foi possível a obtenção de resultado válido para 10 citologias. Agrupando-se as mulheres de acordo com a faixa etária, ≤30 anos e >30 anos de idade, verificou-se taxa de positividade para HPV-AR de 70,1% e 37,9% para o primeiro e segundo grupo respectivamente [Tabela 6].

Avaliando-se isoladamente os dois grupos com citologia cervical de ASC-US e LIEBG verificou-se 27,2% e 69,7% de positividade para o Teste Cobas 4800® respectivamente.

Tabela 6 – Número e porcentagem de pacientes segundo pesquisa para detecção de HPV-AR estratificadas por faixa etária (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

Faixa etária	Teste Cobas 4800®(*)			
	HPV-AR+	HPV-16+	HPV-18+	12 outros HPV-AR+
≤30 anos (n=67)	47 (70,1%)	15 (22,4%)	7 (10,4%)	32 (47,8%)
>30 anos (n=124)	47 (37,9%)	10 (8,0%)	4 (3,2%)	40 (32,2%)
Total (n=191)	94 (49,2%)	25 (13,1%)	11 (5,7%)	72 (37,7%)

(*) Foram excluídos da análise os 10 casos com resultados inválidos para Teste Cobas 4800®.

HPV-AR+: amostras citológicas positivas para o Teste Cobas 4800® (independente do subtipo viral)

HPV-16+: amostras citológicas positivas para o subtipo 16 do Papilomavírus Humano

HPV-18+: amostras citológicas positivas para o subtipo 18 do Papilomavírus Humano

12 outros HPV-AR+: amostras citológicas positivas para um ou mais subtipos do Papilomavírus Humano, considerando-se os pertencentes ao grupo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68

4.2.1 Sensibilidade e especificidade da pesquisa de DNA-HPV no diagnóstico de lesões intraepiteliais de alto grau (NICII/III)

A pesquisa para detecção de HPV-AR revelou-se positiva para 27 dos 31 casos com confirmação histológica de lesão intraepitelial de alto grau (NICII/III) [Tabela 7].

Tabela 7 – Número e percentagem de pacientes segundo o resultado da pesquisa para detecção de HPV-AR e a avaliação combinada colpo-histológica (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

Avaliação colpo-histológica	Teste Cobas 4800®(*)		p
	Negativo	Positivo	
Negativo para Neoplasia (n=91)	66 (72,5%)	25 (27,5%)	
NICI (n=67)	26 (38,8%)	41 (61,2%)	$P < 0,001^{(a)}$
NICII/III (n=31)	4 (12,9%)	27 (87,1%)	

(*) Foram excluídos da análise os 10 casos com resultados inválidos para Teste Cobas 4800® e os 2 casos com histologia inconclusiva.

NICI: lesão intraepitelial de baixo grau (grau I)

NICII/III: lesão intraepitelial de alto grau (graus II e III)

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

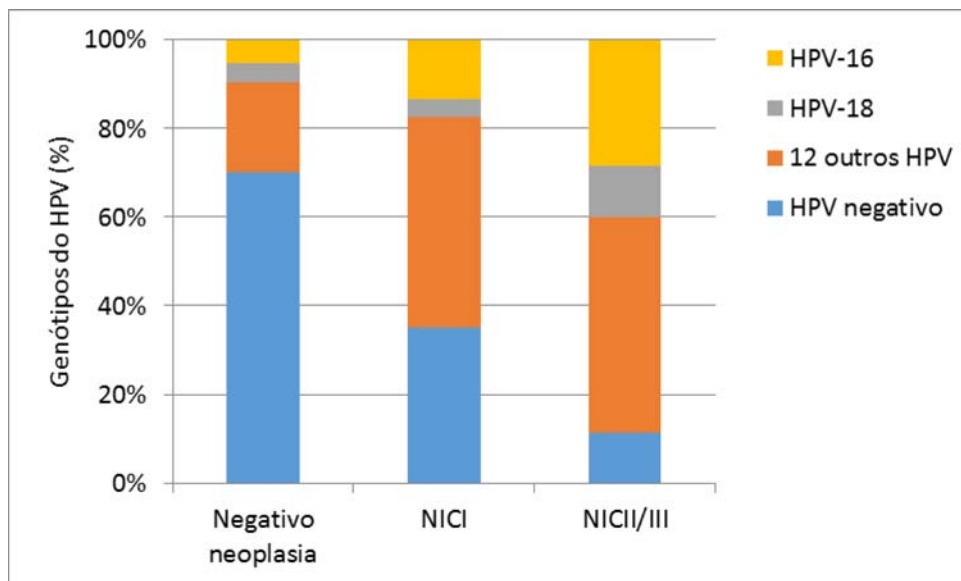


Figura 8 – Distribuição dos resultados do teste para detecção do Papilomavírus Humano (HPV) de acordo com o diagnóstico colpo-histológico entre as mulheres com citologia cervical de ASC-US e LIEBG.

HPV-16: amostras citológicas positivas para o subtipo 16 do Papilomavírus Humano

HPV-18: amostras citológicas positivas para o subtipo 18 do Papilomavírus Humano

12 outros HPV-AR: amostras citológicas positivas para um ou mais subtipos do Papilomavírus Humano, considerando-se os pertencentes ao grupo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68

NICI, II, III: Neoplasia intraepitelial cervical graus I, II e III

Independentemente do resultado do teste de Papanicolaou, se ASC-US ou LIEBG, verificou-se crescente participação dos subtipos virais 16 e 18 diretamente relacionada à gravidade da lesão epitelial diagnosticada pelo exame anatomopatológico. Concomitantemente, as taxas de testes negativos para a presença de HPV-AR apresentam os menores níveis entre as mulheres com diagnóstico de LIEAG [Figura 8].

De acordo com números apresentados, o Teste Cobas 4800® conferiu sensibilidade de 87,1% e especificidade de 58,2% na detecção de lesão NICII/III entre as pacientes com citologia cervical de ASC-US e LIEBG, sendo verificado ainda, valor preditivo negativo (VPN) de 95,8%.

Quando se analisa o desempenho do Teste Cobas 4800® no diagnóstico de NICII/III agrupando-se as pacientes do estudo em faixas etárias ≤30 anos e >30 anos, identifica-se ganho tanto na sensibilidade quanto na especificidade do teste em relação ao grupo de mulheres mais velhas [Tabela 8].

Tabela 8 – Número e porcentagem de pacientes segundo o resultado da pesquisa para detecção de HPV-AR e a avaliação combinada colpo-histológica agrupadas por faixa etária (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

<i>Avaliação colpo-histológica agrupada por faixa etária</i>		<i>Teste Cobas 4800®(*)</i>		<i>p</i>
		<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	
<i>≤30 anos</i>	<i>Negativo para Neoplasia</i>	12 (60,0%)	8 (40,0%)	<i>p = 0,001^(a)</i>
	<i>NICI</i>	4 (13,3%)	26 (86,7%)	
	<i>NICII/III</i>	3 (18,8%)	13 (81,2%)	
<i>>30 anos</i>	<i>Negativo para Neoplasia</i>	54 (76,0%)	17 (24,0%)	<i>p < 0,001^(a)</i>
	<i>NICI</i>	22 (59,5%)	15 (40,5%)	
	<i>NICII/III</i>	1 (6,7%)	14 (93,3%)	

(*) Foram excluídos da análise os 10 casos com resultados inválidos para Teste Cobas 4800® e os 2 casos com histologia inconclusiva.

NICI: lesão intraepitelial de baixo grau (grau I)

NICII/III: lesão intraepitelial de alto grau (graus II e III)

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

Analisando-se separadamente os dois grupos, verifica-se que entre as mulheres com idade superior a 30 anos, houve incremento das taxas de sensibilidade de 87,1% para 93,3% e de especificidade de 58,2% para 70,4%.

O Teste Cobas 4800® comportou-se de maneira distinta no diagnóstico de NICII/III quando comparados os grupos com citologia de ASC-US e LIEBG. Apresentou taxas de sensibilidade e especificidade de 87,5% e 79,5% respectivamente entre as mulheres com citologia cervical de ASC-US, ao passo que para o grupo com citologia de LIEBG demonstrou sensibilidade de 87% e especificidade de 34,7% na detecção de lesões precursoras [Figura 9].

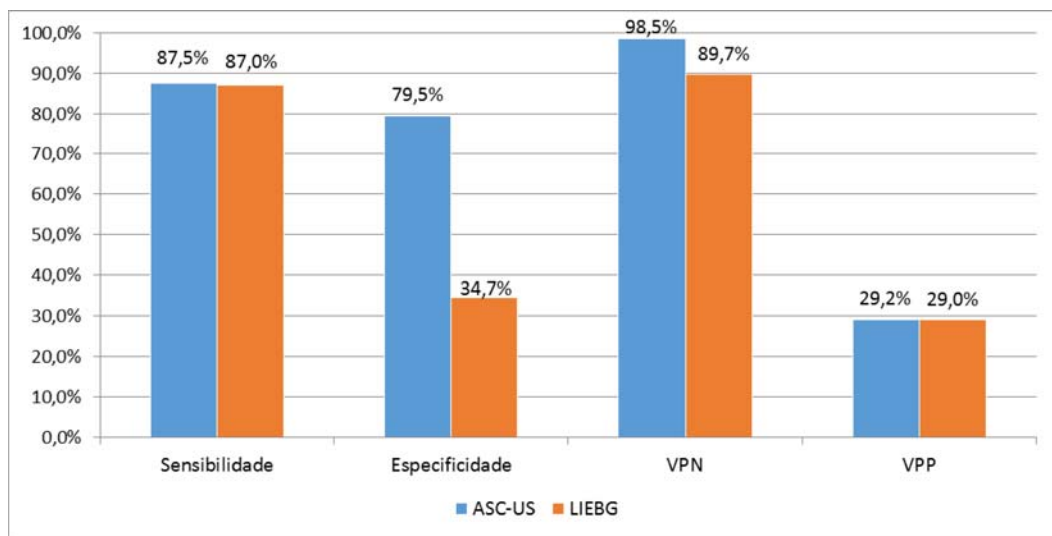


Figura 9 – Sensibilidade, especificidade, VPN e VPP do Teste Cobas 4800® na detecção de lesões precursoras (NICII/III) entre pacientes com citologia de ASC-US e LIEBG.

NICII/III: lesão intraepitelial de alto grau (graus II e III)

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau

VPN: valor preditivo negativo / VPP: valor preditivo positivo

4.2.2 Resultados dos testes imunocitoquímicos (ICQ) para pesquisa combinada dos biomarcadores p16^{INK4a} e Ki-67

Cerca de um quarto (23,9%) das 201 amostras testadas foram positivas para a dupla marcação citoplasmática/nuclear p16 e Ki-67 através do teste CINTec® PLUS, sendo que, entre as mulheres com citologia cervical de ASC-US e LIEBG o índice de positividade para o exame foi de 11,5% e 35,2% respectivamente.

4.2.3 Sensibilidade e especificidade do teste de imunocitoquímica no diagnóstico de lesões intraepiteliais de alto grau (NICII/III)

A dupla marcação p16/Ki-67 revelou-se positiva para 21 dos 31 casos com confirmação histológica de lesão intraepitelial de alto grau (NICII/III) [Tabela 9].

Tabela 9 – Número e percentagem de pacientes segundo o resultado do teste de imunocitoquímica (dupla marcação p16/Ki-67) e a avaliação combinada colpo-histológica (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

<i>Avaliação colpo-histológica</i>	<i>CINtec® PLUS(*)</i>		<i>p</i>
	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	
<i>Negativo para Neoplasia (n=97)</i>	88 (90,7%)	9 (9,3%)	
<i>NICI (n=71)</i>	54 (76,0%)	17 (24,0%)	<i>p < 0,001^(a)</i>
<i>NICII/III (n=31)</i>	10 (32,3%)	21 (67,7%)	

(*) *Foram excluídos da análise os 2 casos com histologia inconclusiva.*

NICI: lesão intraepitelial de baixa grau (grau I)

NICII/III: lesão intraepitelial de alto grau (graus II e III)

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

De acordo com números apresentados, o teste CINtec® PLUS conferiu sensibilidade global de 67,7% e especificidade de 84,5% na detecção de lesão NICII/III entre as pacientes com citologia cervical de ASC-US e LIEBG, sendo verificado ainda, valor preditivo negativo (VPN) de 93,4% [Figura 10].

Ao se analisar o desempenho da ICQ no diagnóstico de NICII/III agrupando-se as pacientes do estudo em faixas etárias ≤ 30 anos e > 30 anos, verificou-se taxas de sensibilidade e especificidade de 81,2% e 74,5% respectivamente para o grupo de mulheres mais jovens e 53,3% e 88,9% para as mulheres com idade superior a 30 anos [Tabela 10].

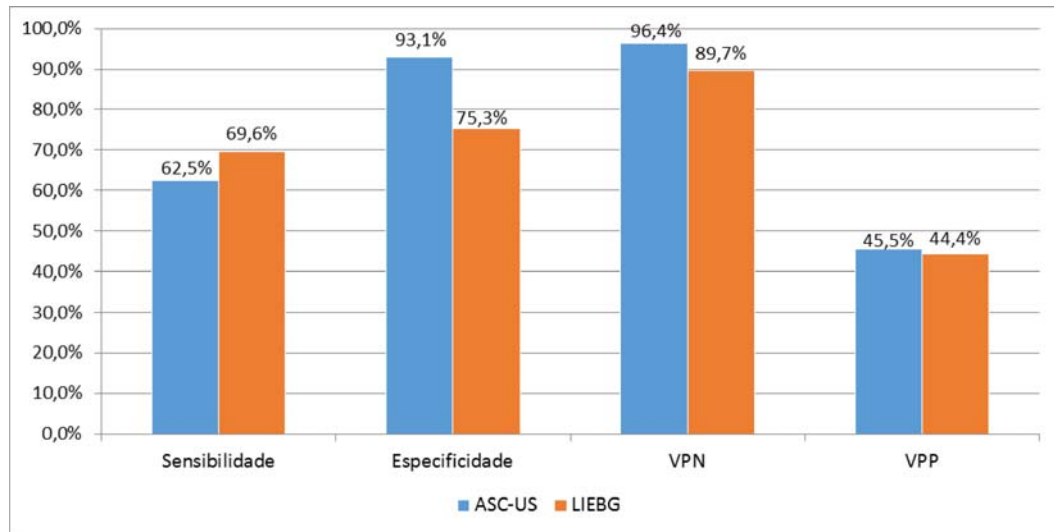


Figura 10 – Sensibilidade, especificidade, VPN e VPP da imunocitoquímica (CINTec® PLUS) na detecção de lesões precursoras (NICII/III) entre pacientes com citologia de ASC-US e LIEBG.

NICII/III: lesão intraepitelial de alto grau (graus II e III)

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau

VPN: valor preditivo negativo / VPP: valor preditivo positivo

Tabela 10 – Número e porcentagem de pacientes segundo o resultado do teste de ICQ (dupla marcação p16/Ki-67) e a avaliação combinada colpo-histológica agrupadas por faixa etária (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

Avaliação colpo-histológica agrupada por faixa etária		CINTec® PLUS (*)		p
		Negativo	Positivo	
≤30 anos	Negativo para Neoplasia	18 (90,0%)	2 (10,0%)	<i>p</i> < 0,001 ^(a)
	NICI	20 (64,5%)	11 (35,5%)	
	NICII/III	3 (18,8%)	13 (81,2%)	
>30 anos	Negativo para Neoplasia	70 (90,9%)	7 (9,1%)	<i>p</i> < 0,001 ^(a)
	NICI	34 (85,0%)	6 (15,0%)	
	NICII/III	7 (46,7%)	8 (53,3%)	

(*) Foram excluídos da análise os 2 casos com histologia inconclusiva.

NICI: lesão intraepitelial de baixo grau (grau I)

NICII/III: lesão intraepitelial de alto grau (graus II e III)

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

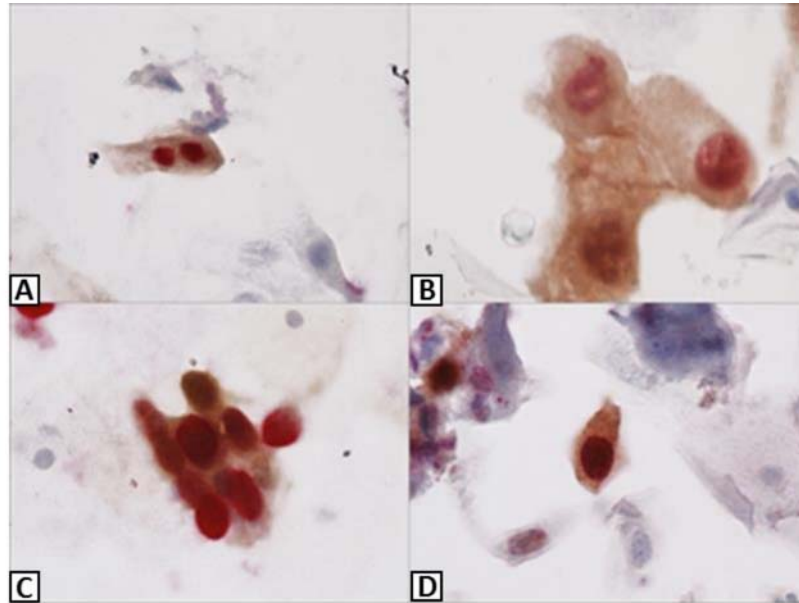


Figura 11 – Exemplos de testes positivos para a dupla marcação nuclear com Ki-67 (avermelhada) e citoplasmática com p16 (acastanhada) entre pacientes do grupo de estudo. A e D com aumento de 200X, B e C com aumento de 400X.

4.3 Desempenho comparativo entre os testes de detecção de HPV-AR e ICQ na predição de lesão intraepitelial de alto grau

Com o intuito de se avaliar o desempenho dos testes para pesquisa de HPV-AR e de ICQ, isolados e em associação, calculou-se a área sob a curva ROC levando-se em consideração a população geral do estudo e os resultados de ambos os testes em relação à citologia cervical (ASC-US ou LIEBG) e as faixas etárias agrupadas (≤ 30 anos e > 30 anos de idade) [Tabela 11].

Analisando-se isoladamente os dois grupos com resultados distintos de citologia cervical, identificou-se entre as mulheres com Papanicolaou de ASC-US desempenho semelhante dos testes para pesquisa de HPV-AR e imunocitoquímica na detecção de LIEAG. Obteve-se área sob a curva ROC de 0,835 (IC95%:0,743-0,905) para o teste Cobas 4800® e 0,778 (IC95%:0,682-0,858) para o teste CINtec® PLUS ($p=0,489$) [Figura 12]. Para as mulheres com exames citopatológicos categorizados como LIEBG verificou-se área sob a curva ROC de 0,608 (IC95%:0,508-0,709) para o Cobas 4800® e 0,724 (IC95%:0,625-0,805) para o CINtec® PLUS ($p=0,151$) [Figura 13].

Tabela 11 – Desempenho comparativo dos testes para pesquisa de DNA-HPV e imunocitoquímica no diagnóstico de lesões de alto grau (NICII/III) de acordo com os parâmetros de sensibilidade, especificidade e área sob a curva ROC (Hospital de Câncer de Barretos, fevereiro/2012 a agosto/2013).

Teste	Sensibilidade	Especificidade	Área sob a curva ROC	IC95%		p(*)
				Inferior	Superior	
<i>Todas as idades com citologia de ASC-US ou LIEBG</i>						
Cobas 4800®	87,1%	58,2%	0,727	0,655	0,787	0,532
CINtec® PLUS	67,7%	84,5%	0,761	0,699	0,821	
<i>Todas as idades com citologia de ASC-US</i>						
Cobas 4800®	87,5%	79,5%	0,835	0,743	0,905	0,489
CINtec® PLUS	62,5%	93,1%	0,778	0,682	0,858	
<i>≤30 anos com citologia de ASC-US</i>						
Cobas 4800®	50,0%	66,7%	0,583	0,345	0,768	0,088
CINtec® PLUS	50,0%	85,7%	0,679	0,471	0,868	
<i>>30 anos com citologia de ASC-US</i>						
Cobas 4800®	100%	83,9%	0,919	0,837	0,976	0,307
CINtec® PLUS	66,7%	95,5%	0,810	0,695	0,889	
<i>Todas as idades com citologia de LIEBG</i>						
Cobas 4800®	87,0%	34,7%	0,608	0,508	0,709	0,099
CINtec® PLUS	69,6%	75,3%	0,724	0,625	0,805	
<i>≤30 anos com citologia de LIEBG</i>						
Cobas 4800®	85,7%	6,9%	0,463	0,312	0,623	<0,001
CINtec® PLUS	85,7%	66,7%	0,762	0,622	0,885	
<i>>30 anos com citologia de LIEBG</i>						
Cobas 4800®	88,9%	52,2%	0,705	0,571	0,824	0,408
CINtec® PLUS	44,4%	80,4%	0,624	0,482	0,740	

(*) teste de associação comparativo entre as áreas sob a curva ROC

IC95%: intervalo de confiança de 95%

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau

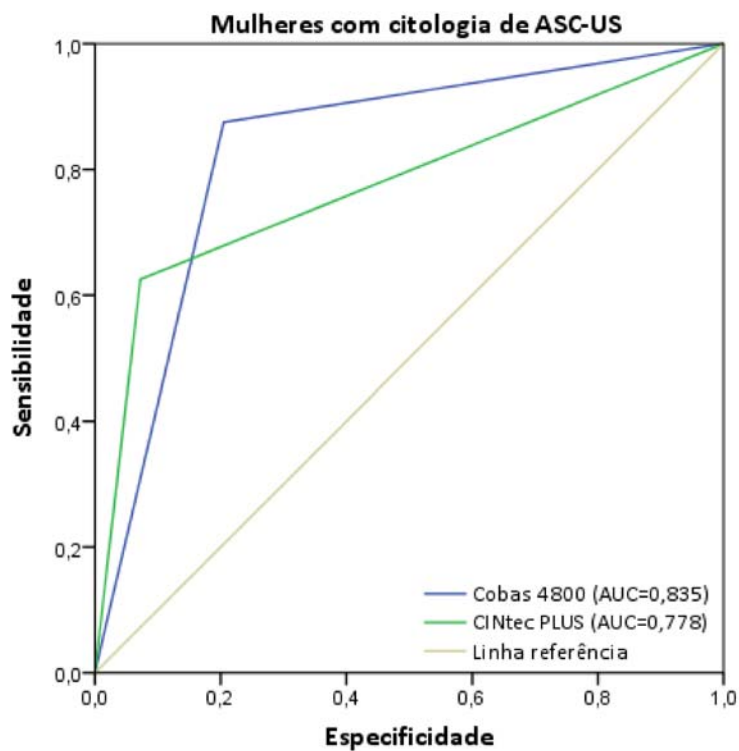


Figura 12 – Curva ROC representativa do desempenho dos testes Cobas 4800® e CINtec® PLUS na detecção de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia cervical de ASC-US.

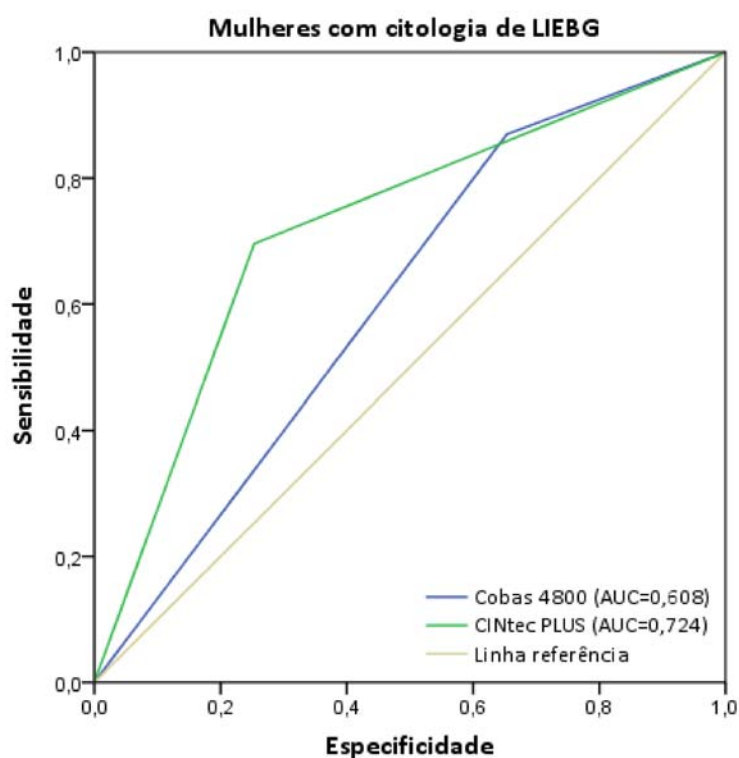


Figura 13 – Curva ROC representativa do desempenho dos testes Cobas 4800® e CINtec® PLUS na detecção de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia cervical de LIEBG.

Para ambos os métodos avaliados constatou-se incremento dos valores da área sob a curva ROC entre as mulheres com idade superior a 30 anos seja para aquelas com citologia cervical de ASC-US ou LIEBG quando empregado a pesquisa para DNA-HPV.

Levando-se em consideração apenas as mulheres com citologia de ASC-US e idade acima de 30 anos, verificou-se área sob a curva ROC de 0,919 (IC95%:0,837-0,976) para a pesquisa de HPV-AR e de 0,810 (IC95%:0,695-0,889) para a ICQ na predição de LIEAG ($p=0,307$) [Figura 14]. Para as mulheres pertencentes à mesma faixa etária (>30 anos) porém com Papanicolaou categorizado como LIEBG encontrou-se para o teste Cobas 4800® área sob a curva ROC de 0,705 (IC95%:0,571-0,824) e de 0,624 (IC95%:0,482-0,740) para o CINtec® PLUS com valor de $p=0,408$ [Figura 15].

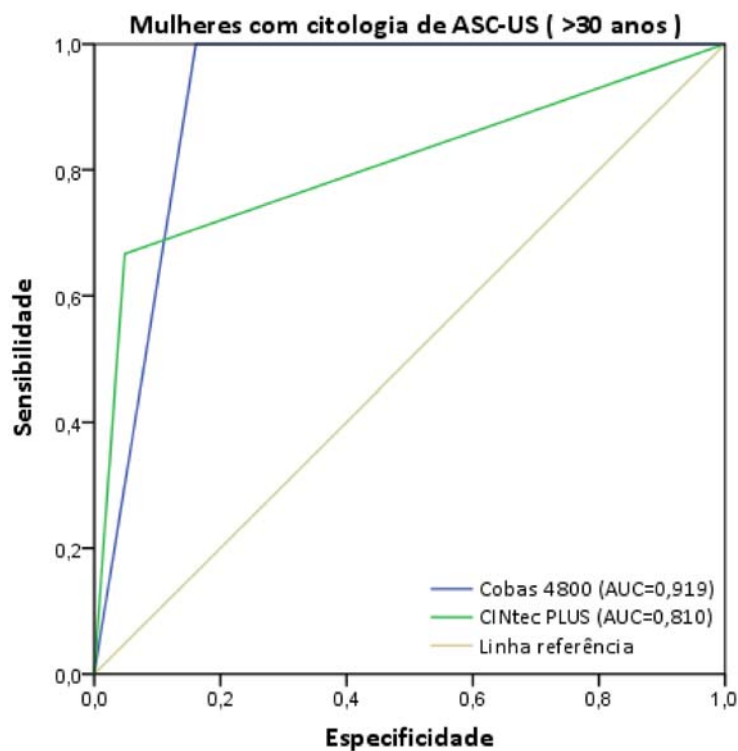


Figura 14 – Curva ROC representativa do desempenho dos testes Cobas 4800® e CINtec® PLUS na detecção de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia cervical de ASC-US acima dos 30 anos de idade.

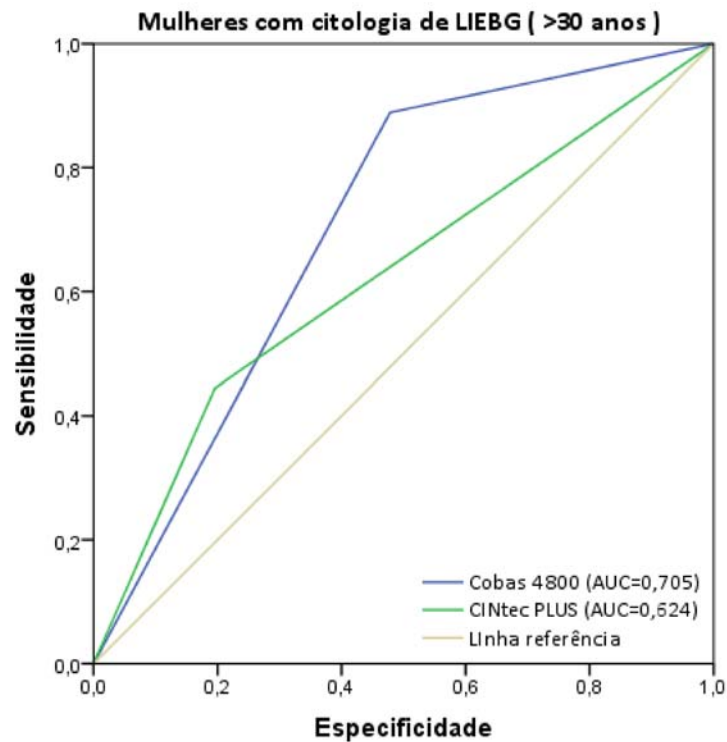


Figura 15 – Curva ROC representativa do desempenho dos testes Cobas 4800® e CINTec® PLUS na detecção de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia cervical de LIEBG acima dos 30 anos de idade.

Verifica-se que a área sob a curva ROC tanto para o teste Cobas 4800® como para o CINTec® PLUS apresentou valores mais elevados para as mulheres com citologia cervical de ASC-US acima dos 30 anos de idade.

Em contrapartida, para o grupo de mulheres mais jovens com idade igual ou inferior a 30 anos, o teste CINTec® PLUS demonstrou maior área sob a curva ROC tanto para mulheres com citologia de ASC-US como para LIEBG com valores de 0,679 e 0,762 respectivamente, sendo que em relação às mulheres com LIEBG apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao teste de HPV [Figura 16].

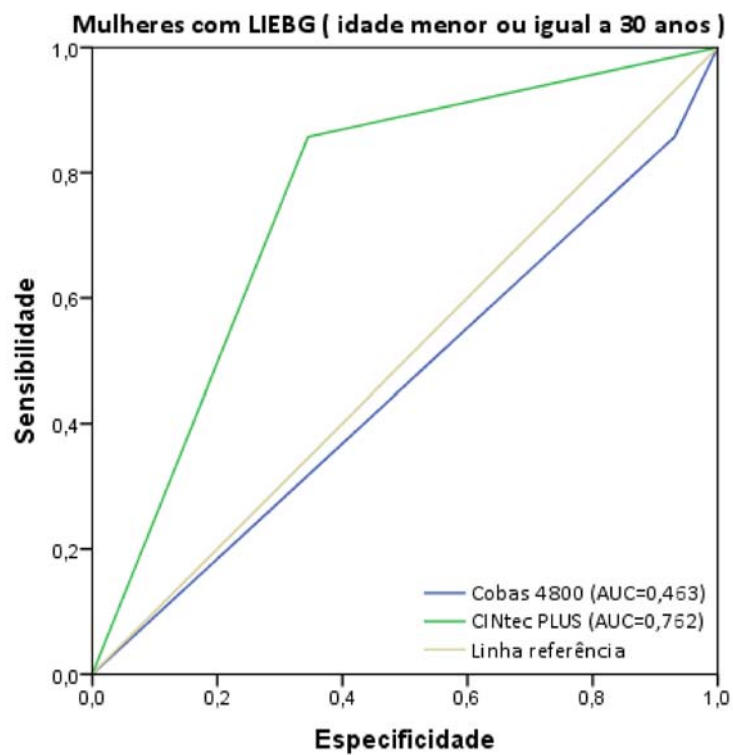


Figura 16 – Curva ROC representativa do desempenho dos testes Cobas 4800® e CINtec® PLUS na detecção de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia cervical de LIEBG com idade menor ou igual a 30 anos.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

São indiscutíveis os avanços proporcionados pela citologia oncótica na prevenção de doença neoplásica invasiva da cervix uterina. Os favoráveis indicadores de incidência e mortalidade observados comumente em diversos países europeus, da América do Norte e Japão¹⁷ são prova irrefutável da contribuição do exame de Papanicolaou no incremento da detecção precoce de atipias celulares potencialmente cancerígenas o que facilita sobremaneira o manejo terapêutico possibilitando elevadas taxas de cura.

Cabe ressaltar, que o potencial benefício oferecido pela citologia cervical está diretamente relacionado à capacidade de cada região ou país em estruturar um eficiente programa de rastreamento organizado que contemple pré-requisitos imprescindíveis, a saber: confecção de banco de dados com informações sobre a população-alvo a ser rastreada e atualizações periódicas sobre a conformidade dos intervalos de realização dos exames; montagem de uma ágil rede de convocação das usuárias em não conformidade com os prazos de repetição dos exames e daquelas com testes positivos que necessitem de avaliação complementar; implementação de iniciativas responsáveis de educação voltadas para a formação e requalificação de profissionais que atuam em todas as etapas do processo de rastreamento; garantir às usuárias com testes alterados pronta investigação adicional e encaminhamento prioritário para tratamento das mulheres com lesões cervicais invasivas confirmadas. Adicionalmente, é necessário garantir rigorosos critérios de qualidade em todas as etapas do rastreamento com monitoramento ativo e contínuo.

Contudo, mesmo empenhando-se na implementação de um primoroso sistema organizado de rastreamento do câncer do colo uterino, as limitações inerentes ao emprego isolado da citologia cervical não poderão ser totalmente superadas. O Papanicolaou, em diferentes revisões, demonstrou grandes variações tanto nas taxas de sensibilidade quanto especificidade em diagnosticar lesões intraepiteliais de alto grau, sendo a sensibilidade influenciada por diversas variáveis tendo demonstrado índices decepcionantes em algumas casuísticas^{18, 19}. Além disso, estima-se ainda, taxas entre 5% e 20% de testes falso-negativos²⁰ na população geral o que pode representar resultado danoso à mulher falsamente tranquilizada por exame equivocado.

Diferentes fatores estão implicados para a ocorrência não desprezível de resultados falso-negativos no emprego do Papanicolaou, sobretudo aqueles relacionados à inadequações na coleta do esfregaço cervical e equívocos no preparo das lâminas e interpretação dos achados citológicos.

Neste estudo objetivou-se avaliar o desempenho de duas tecnologias, relativamente recentes, em prever a presença de lesões clinicamente relevantes entre mulheres com resultado de Papanicolaou com atipias mínimas. A busca por novos instrumentos que possam complementar ou até mesmo substituir o uso da citologia cervical no rastreamento das lesões precursoras e do câncer do colo uterino se justifica pelas já citadas limitações apresentadas pelo teste de Papanicolaou.

Foram avaliadas 201 mulheres que realizaram testes de Papanicolaou atendidas pelo Departamento de Prevenção do HCB que possui reconhecida experiência em programas de rastreamento populacional de câncer, mais especificamente em câncer de mama e colo uterino, por meio da utilização de Unidades Móveis (UM) de atendimento^{53, 54}. As mulheres com laudo citológico de ASC-US (n=96) e LIEBG (n=105) foram convocadas para avaliação complementar através de exame colposcópico com intuito de diagnosticar possíveis casos de lesões intraepiteliais de alto grau (NICII/III).

Análise das mulheres com citologia de ASC-US

As citologias com alterações classificadas como *células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas* (ASC-US) permanecem um desafio do ponto de vista de conduta clínica por apresentarem critérios de diagnóstico pouco precisos com questionáveis índices de concordância entre citopatologistas experientes²² e não raramente ocultarem diagnóstico de lesões precursoras ou até mesmo francamente invasivas.

Diferentes protocolos de seguimento para as mulheres com ASC-US têm sido propostos na tentativa de se minimizar possíveis equívocos com resultados falso-negativos. O *Consensus Guidelines for the Management of Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors* atualizado em 2012³³ preconiza preferencialmente a realização de

teste para HPV-AR entre mulheres com ASC-US com idade igual ou superior a 25 anos e posterior encaminhamento para colposcopia dos casos HPV-positivo. As *Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero* reeditadas em 2011⁵¹ indicam a repetição da citologia cervical após 6 meses para mulheres acima dos 30 anos ou em 12 meses para mulheres entre 25 e 30 anos e na persistência de atipias celulares recomendam a realização de exame colposcópico.

Neste estudo, para as mulheres com Papanicolaou classificado como ASC-US verificou-se que 8,4% delas após a avaliação colpo-histológica possuíam em verdade diagnóstico de LIEAG. Essa porcentagem está de acordo com os índices descritos na literatura que variam de 5% a 22%²³⁻²⁵.

Não identificou-se diferença entre os grupos de mulheres com idade ≤ 30 anos ou > 30 anos, com taxas de 8,6% e 8,4% de LIEAG respectivamente. Não foram diagnosticados casos de câncer do colo uterino entre as mulheres com citologia de ASC-US avaliadas. Após a análise histopatológica três casos apresentaram discordância na avaliação dos patologistas responsáveis pelo escrutínio tendo sido realizado teste de imunistoquímica adicional (identificação da proteína p16) para auxílio diagnóstico. Os casos discordantes foram categorizados posteriormente como NICII.

Lapierre SG et al. avaliaram 396 mulheres com citologia de ASC-US e obtiveram índice de diagnóstico de lesões precursoras (NICII/III) de 7,3% num grupo de pacientes com média de idade de 38 anos²⁶, resultado semelhante aos verificados neste estudo que englobou mulheres com média de idade de 39,2 anos.

A pesquisa para detecção de HPV-AR utilizando-se o teste Cobas 4800® foi positiva para 27,2% (25/92) das mulheres com ASC-US, independentemente do subgrupo viral identificado, sendo que 34,8% (8/23) das mulheres com idade ≤ 30 anos foram positivas para HPV-AR e 24,6% (17/69) das mulheres acima dos 30 anos foram positivas para HPV-AR. Stoler MH et al. avaliando mulheres com idade ≥ 21 anos e utilizando-se do mesmo método para pesquisa de HPV obtiveram 32,6% de positividade entre o grupo com Papanicolaou de ASC-US e semelhantemente ao verificado nesse estudo, também observaram declínio nas taxas de infecção por HPV-AR no subgrupo com idade ≥ 30 anos, tendo obtido índice de positividade de 22,2%²⁴.

Outras publicações tem demonstrado índices mais elevados de prevalência da infecção pelo HPV-AR entre mulheres com Papanicolaou de ASC-US. O ALTS (*ASC-US/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study*) detectou a presença de HPV-AR em 48% das amostras com citologia de ASC-US utilizando-se HC2⁵⁵, enquanto que Einstein MH et al. apontaram uma prevalência de 57,1%⁵⁶. Essas diferenças, muito provavelmente refletem a heterogeneidade nas populações estudadas no que se refere a faixa etária das mulheres avaliadas, uma vez que as jovens estão proporcionalmente mais susceptíveis à infecções pelo HPV. Em ambas as pesquisas citadas a média de idade aproximou-se dos 30 anos, menor portanto que a média de idade das mulheres deste estudo.

Stoler MH et al. utilizando-se do teste Cobas 4800® demonstraram aumento da participação dos subtipos virais HPV-16 e HPV-18, seja isoladamente ou em associação, como responsáveis pela infecção entre pacientes com lesões epiteliais mais acentuadas²⁴. Esse mesmo comportamento também foi evidenciado nesse estudo entre as mulheres com citologia de ASC-US, sendo que, 12% das mulheres com LIEBG confirmada por biópsia apresentaram infecção por HPV 16 e/ou 18, ao passo que entre as mulheres com NICII/III a taxa de infecção pelos subtipos virais 16 e/ou 18 elevou-se para 37,5%.

A sensibilidade do teste Cobas 4800® em predizer a presença de LIEAG entre as mulheres com citologia de ASC-US foi de 87,5% e a especificidade de 79,5% com valor preditivo positivo (VPP) de 29,2% e alto valor preditivo negativo igual a 98,5%. Esses valores são semelhantes aos descritos em outros estudos que também utilizaram o teste Cobas 4800® para detecção de HPV^{24, 26, 37} e indicam o potencial benefício da pesquisa de HPV-AR nessa população ao praticamente eliminar a possibilidade de lesões cervicais relevantes entre mulheres com testes negativos.

Levando-se em consideração separadamente as mulheres com idade ≤ 30 anos e > 30 anos, constatou-se elevação tanto na sensibilidade quanto na especificidade do Cobas 4800® em detectar LIEAG entre as mulheres mais velhas chegando a taxas de 100% tanto para a sensibilidade como para o VPN e especificidade de 83,9%. Cabe ressaltar, que essa avaliação conjunta que considera a faixa etária em associação ao status da infecção pelo HPV-AR entre mulheres com citologia de ASC-US é de extrema importância pela real possibilidade de interferir na conduta clínica guiando o manejo mais adequado dessas pacientes.

Em relação a imunocitoquímica para detecção combinada dos biomarcadores p16/Ki-67 utilizando-se o teste CINtec® PLUS, 11,5% (11/96) das mulheres com ASC-US foram positivas para o exame. Entre o grupo mais jovem (≤ 30 anos), o índice de positividade foi de 17,4% (4/23) enquanto que para as mulheres com idade superior a 30 anos 9,6% foram positivas para a ICQ.

Investigando-se a acurácia da ICQ na detecção de LIEAG entre mulheres com citologia de ASC-US, verificou-se taxas de sensibilidade e especificidade de 62,5% e 93,1% respectivamente, com VPN de 96,4% e VPP de 45,5%. Comparativamente ao teste de HPV, a ICQ conferiu melhor especificidade, porém, com decréscimo na taxa de sensibilidade, o que equivale a dizer que o teste de HPV embora consiga identificar um maior número de pacientes com lesões cervicais relevantes acaba por encaminhar desnecessariamente um contingente maior de mulheres para colposcopia quando comparado à ICQ. Semelhantemente ao verificado para a pesquisa do HPV, a ICQ também conferiu alto valor preditivo negativo (96,4%), o que diminui sobremaneira a existência de LIEAG entre mulheres com Papanicolaou de ASC-US e CINtec® PLUS negativo.

Quando se estratifica as mulheres com ASC-US de acordo com a faixa etária constata-se diminuição tanto da sensibilidade (50,0%) quanto na especificidade (85,7%) da ICQ em prever a presença de NICII/III entre as pacientes mais jovens (≤ 30 anos), comportamento esse semelhante ao verificado no desempenho da pesquisa para HPV-AR.

Alguns autores têm demonstrado taxas de sensibilidade mais elevadas que variam de 86% a 92% e menores taxas de especificidade que variam de 59% a 81%^{46, 47}. Entretanto, Edgerton N et al. também verificaram taxa de sensibilidade de 64% para a dupla-marcação p16/Ki-67 no diagnóstico de LIEAG entre mulheres com citologia de ASC-US²⁵. A análise de um possível ganho nas taxas de sensibilidade da ICQ em prever a presença especificamente de NICIII entre as pacientes com ASC-US neste estudo, mostrou-se limitada pelo pequeno número (n=3) de mulheres que receberam esse diagnóstico histopatológico.

Quando se compara o desempenho dos dois métodos (teste HPV e ICQ) em prever a presença de LIEAG entre mulheres com citologia de ASC-US, verificou-se que ambos os testes apresentam performances igualmente satisfatórias principalmente entre o grupo de mulheres acima dos 30 anos e que embora a pesquisa para identificação de DNA-HPV (Cobas 4800®) tenha demonstrado maior área sob a curva ROC tanto na análise global quanto entre

a população de mulheres mais velhas chegando ao valor de 0,919, não houve diferença estatisticamente significativa em relação à acurácia do exame de imunocitoquímica ($p=0,307$).

Análise das mulheres com citologia de LIEBG

O diagnóstico citológico de lesão intraepitelial cervical de baixo grau (LIEBG) se baseia principalmente na presença dos chamados coilócitos (halo perinuclear irregular com margens distintas que aparenta ausência de conteúdo no seu interior) que indicam infecção pelo HPV, além de alterações na relação núcleo/citoplasma e hiper cromasia discreta.

No Brasil, a prevalência de LIEBG é de aproximadamente 0,8% entre todos os exames citopatológicos realizados e de 31% considerando-se apenas os testes anormais⁵¹. Estudo avaliando os resultados de exames de colpocitologia analisados pelo Laboratório de Citopatologia do HCB identificou taxas de 0,3% e 0,7% de LIEBG entre testes que empregaram os métodos de citologia convencional e em meio líquido respectivamente⁵⁷.

Os diversos protocolos internacionais preconizam condutas diferentes para as pacientes com diagnóstico citológico de LIEBG que variam entre a repetição do Papanicolaou em intervalos pré-estabelecidos e o encaminhamento direto para avaliação colposcópica, sendo que o ALTS (*ASC-US/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study*) demonstrou serem ambas as condutas igualmente aceitáveis³⁴. As *Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero* recomendam a repetição do exame citopatológico após 6 meses para mulheres acima dos 20 anos de idade e posterior encaminhamento para colposcopia naqueles casos que mantêm atipias celulares⁵¹.

A presença de lesões precursoras (NICII/III) entre as mulheres com exames citológicos categorizados como LIEBG não é desprezível sendo descritos na literatura índices que variam de 9% a 30%^{27-29, 58}. Especificamente neste estudo, verificou-se que 22,1% (23/104) das mulheres com LIEBG apresentavam em verdade diagnóstico de NICII ou NICIII histológico. Entre as mulheres mais jovens (≤ 30 anos) o diagnóstico de LIEAG chegou a 31,9% (25% NICII, 6,9% NICIII) dos casos, porcentagem superior ao evidenciado entre as mulheres acima dos 30 anos que foi de 15%. Em seis casos houve discordância na avaliação histológica entre os

médicos patologistas responsáveis, tendo sido empregado teste de imunoistoquímica (marcação da proteína p16) para auxiliar no diagnóstico sendo posteriormente classificados como NICII.

O teste para pesquisa de HPV-AR (Cobas 4800®) mostrou-se positivo para 69,7% das mulheres com citologia de LIEBG. Quando se avalia os resultados do HPV entre as faixas etárias verifica-se taxas ainda mais elevadas de infecção por HPV de alto risco oncogênico entre as mulheres mais jovens com índice que chegou a 88,6% de positividade. A predominância da infecção por HPV dos subtipos oncogênicos mesmo entre mulheres com lesão intraepitelial de baixo grau tem sido demonstrada por diferentes autores que rotineiramente também verificam tendência de queda nos níveis de infecção diretamente relacionada ao aumento da idade^{39, 59}.

Levando-se em consideração a presença de infecção pelos genótipos 16 e/ou 18 do Papilomavírus Humano entre as pacientes com citologia de LIEBG, verificou-se índices de positividade de 24,4% entre os casos confirmados de NICI e 43,5% entre as mulheres com confirmação histopatológica de NICII/III.

O teste Cobas 4800® conferiu sensibilidade e especificidade de 87% e 34,7% respectivamente na predição de NICII/III entre mulheres com citologia LIEBG. Para o grupo de mulheres mais jovens (≤ 30 anos) a sensibilidade e especificidade foi de 85,7% e 6,9% e entre as mulheres com idade superior a 30 anos verificou-se sensibilidade de 88,9% e especificidade de 52,2%. Comparativamente às mulheres com citologia de ASC-US o teste de HPV-AR não demonstra o mesmo desempenho em termos de especificidade entre as mulheres com LIEBG justamente pelo elevado índice de infecção viral pelos subtipos de alto risco verificados nesse último grupo.

O emprego do teste para detecção de HPV-AR entre mulheres com LIEBG não constitui necessariamente a alternativa mais apropriada em indicar quais pacientes estão em maior risco para lesões clinicamente relevantes. Não obstante, seu emprego fatalmente representaria um aumento significativo no encaminhamento para avaliações colposcópicas adicionais acarretando biópsias e tratamentos desnecessários além do potencial impacto psíquico que o diagnóstico de infecção sexualmente transmissível pode gerar entre as mulheres dessa população.

De acordo com os valores de sensibilidade e especificidade já demonstrados, de cada dez pacientes com diagnóstico citológico de LIEBG o teste Cobas 4800® selecionaria sete mulheres para colposcopia para posterior confirmação de NICII/III em apenas duas pacientes. Considerando-se a frequência desse diagnóstico citológico entre todas as colpocitologias anormais justifica-se a inviabilidade do uso isolado do teste de HPV-AR nessas circunstâncias.

Analisando-se o desempenho da imunocitoquímica (CINtec® PLUS) em prever a presença de lesão intraepitelial de alto grau entre mulheres com citologia de LIEBG, constatou-se sensibilidade e especificidade de 69,6% e 75,3% respectivamente. A ICQ (p16/Ki-67) manteve os mesmos índices de sensibilidade (85,7%) que o teste de HPV entre as mulheres ≤30 anos obtendo taxa de especificidade comparativamente muito superior de 66,7%. Adicionalmente, individualizando-se a acurácia da ICQ em estratificar o risco para NICIII entre mulheres com citologia de LIEBG verifica-se 100% de sensibilidade e 69,4% de especificidade do teste com VPN também de 100% independentemente da idade, demonstrando melhora do desempenho do teste com a gravidade da lesão diagnosticada.

Schmidt MD et al. obtiveram resultados igualmente significativos ao analisar a acurácia da dupla marcação p16/Ki-67 em prever o diagnóstico de NICIII entre citologias de LIEBG com valores de 95,8% de sensibilidade e 68% de especificidade⁴⁶. Esses resultados, assim como já apontado por outros autores^{25, 47, 60-62}, certamente candidatam a ICQ para p16/Ki-67 a ocupar a lacuna deixada pelo insuficiente desempenho dos testes de HPV-AR em prever lesões clinicamente relevantes entre mulheres com Papanicolaou de LIEBG.

Esses resultados ficam ainda mais evidentes quando analisamos a área sob a curva ROC obtida pelos métodos de ICQ e pelo teste de HPV sobretudo entre as mulheres mais jovens onde a dupla coloração p16/Ki-67 demonstrou acurácia consideravelmente superior em prever a presença de NICII/III ($p < 0,001$).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Ambos os métodos analisados (teste HPV-AR e ICQ) demonstraram comportamento semelhante em prever a presença de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau entre mulheres com citologia de ASC-US, ressaltando-se desempenho superior dos testes entre mulheres com idade acima de 30 anos.

Entre as mulheres mais jovens (≤ 30 anos) com citologia de LIEBG a dupla marcação p16/Ki-67 conferiu maior acurácia na identificação de lesões precursoras, especialmente NICIII, quando comparada ao teste molecular para HPV de alto risco oncogênico. Entre as mulheres com idade superior a 30 anos e Papanicolaou de LIEBG ambos os métodos apresentaram desempenho similar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. **Int J Cancer**. 2010;127(12):2893-917.
2. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil*. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância, editor. **Rio de Janeiro: INCA; 2011**.
3. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, et al. *SEER cancer statistics review, 1975–2008*. **Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2011**.
4. Adegoke O, Kulasingam S, Virnig B. *Cervical cancer trends in the United States: a 35-year population-based analysis*. **J Womens Health (Larchmt)**. 2012;21(10):1031-7.
5. Gonzaga CMR, Freitas-Junior R, Barbaresco AA, Martins E, Bernardes BT, Resende APM. *Cervical cancer mortality trends in Brazil: 1980-2009*. **Cad Saude Publica**. 2013;29(3):599-608.
6. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Atlas de Mortalidade por Câncer*. [Internet] Rio de Janeiro, RJ: INCA; 2012 [cited 11/12/2013]; Available from: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/prepararModelo03.action>.
7. Sankaranarayanan R, Budukh AM, Rajkumar R. *Effective screening programmes for cervical cancer in low-and middle-income developing countries*. **Bull World Health Organ**. 2001;79(10):954-62.
8. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. *Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection*. **Vaccine**. 2006;24:S52-S61.
9. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. *Prevalence of HPV infection among females in the United States*. **JAMA**. 2007;297(8):813-9.
10. Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé 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.

11. Ayres ARG, Silva GA. *Cervical HPV infection in Brazil: systematic review*. **Rev Saude Publica**. 2010;44(5):963-74.
12. Lorenzi AT, Fregnani JHTG, Possati-Resende JC, Neto CS, Villa LL, Longatto-Filho A. *Self-collection for high-risk HPV detection in Brazilian women using the careHPV™ test*. **Gynecol Oncol**. 2013;131(1):131-4.
13. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. **N Engl J Med**. 2003;348(6):518-27.
14. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau M-C, Désy M, et al. *Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer*. **J Infect Dis**. 1999;180(5):1415-23.
15. Trimble CL, Peng S, Thoburn C, Kos F, Wu T. *Naturally occurring systemic immune responses to HPV antigens do not predict regression of CIN2/3*. **Cancer Immunol Immunother**. 2010;59(5):799-803.
16. Sankaranarayanan R, Black RJ, Parkin DM. *Cancer survival in developing countries*. **IARC Scientific Publications N° 15**. Lyon: IARC Press; 1988.
17. Hakama M, Miller AB, Day NE. *Screening for cancer of the uterine cervix*. **IARC Scientific Publications N° 76**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1986.
18. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. *Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review*. **Ann Intern Med**. 2000;132(10):810-9.
19. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. *Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis*. **Obstet Gynecol**. 1998;91(4):626-31.
20. Allen K, Holladay EB. *Risk Management for the Cytology Laboratory*. Raleigh, NC: American Society for Cytotechnology; 2002.
21. Sawaya GF, Grimes DA. *New technologies in cervical cytology screening: a word of caution*. **Obstet Gynecol**. 1999;94(2):307-10.

22. Stoler MH, Schiffman M. *Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study*. **JAMA**. 2001;285(11):1500-5.
23. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. *2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities*. **JAMA**. 2002;287(16):2120-9.
24. Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL. *High-Risk Human Papillomavirus Testing in Women With ASC-US Cytology Results From the ATHENA HPV Study*. **Am J Clin Pathol**. 2011;135(3):468-75.
25. Edgerton N, Cohen C, Siddiqui MT. *Evaluation of CINtec PLUS® testing as an adjunctive test in ASC-US diagnosed SurePath® preparations*. **Diagn Cytopathol**. 2013;41(1):35-40.
26. Lapierre SG, Sauthier P, Mayrand M-H, Dufresne S, Petignat P, Provencher D, et al. *Human papillomavirus (HPV) DNA triage of women with atypical squamous cells of undetermined significance with cobas 4800 HPV and Hybrid Capture 2 tests for detection of high-grade lesions of the uterine cervix*. **J Clin Microbiol**. 2012;50(4):1240-4.
27. Lonky NM, Sadeghi M, Tsadik GW, Petitti D. *The clinical significance of the poor correlation of cervical dysplasia and cervical malignancy with referral cytologic results*. **Am J Obstet Gynecol**. 1999;181(3):560-6.
28. Cox JT, Schiffman M, Solomon D. *Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy*. **Am J Obstet Gynecol**. 2003;188(6):1406-12.
29. Walker JL, Wang SS, Schiffman M, Solomon D. *Predicting absolute risk of CIN3 during post-colposcopic follow-up: results from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS)*. **Am J Obstet Gynecol**. 2006;195(2):341-8.
30. Sadeghi SB, Sadeghi A, Robboy SJ. *Prevalence of dysplasia and cancer of the cervix in a nationwide, planned parenthood population*. **Cancer**. 1988;61(11):2359-61.
31. Cuzick J, Bergeron C, von Knebel Doeberitz M, Gravitt P, Jeronimo J, Lorincz AT, et al. *New Technologies and Procedures for Cervical Cancer Screening*. **Vaccine**. 2012;30, Supplement 5(0):F107-F116.

32. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. *Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population.* **Br J Cancer.** 2013;108(4):908.
33. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. *2012 Updated Consensus Guidelines for the Management of Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors.* **Obstet Gynecol.** 2013;121(4):829-46.
34. ALTS Study Group. *Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance.* **Am J Obstet Gynecol.** 2003;188:1383-92.
35. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. *Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study.* **Lancet Oncol.** 2010;11(11):1048-56.
36. de Oliveira CM, Fregnani JHTG, Carvalho JP, Longatto-Filho A, Levi JE. *Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil.* **BMC Cancer.** 2013;13(1):357.
37. White C, Keegan H, Pilkington L, Ruttle C, Kerr P, Sharp L, et al. *Evaluation of the Clinical Performance of the cobas 4800 HPV Test in Patients Referred for Colposcopy.* **J Clin Microbiol.** 2013;51(10):3415-7.
38. Mateos Lindemann ML, Rodriguez Dominguez MJ, Chacón de Antonio J, Sandri MT, Tricca A, Sideri M, et al. *Analytical Comparison of the cobas HPV Test with Hybrid Capture 2 for the Detection of High-Risk HPV Genotypes.* **J Mol Diagn.** 2012;14(1):65-70.
39. Wong AA, Fuller J, Pabbaraju K, Wong S, Zahariadis G. *Comparison of the hybrid capture 2 and cobas 4800 tests for detection of high-risk human papillomavirus in specimens collected in PreservCyt medium.* **J Clin Microbiol.** 2012;50(1):25-9.
40. zur Hausen H. *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.* **Nat Rev Cancer.** 2002;2(5):342-50.
41. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. *p16^{INK4a} immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review and meta-analysis.* **Cancer Treat Rev.** 2009;35(3):210-20.

42. Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P. *Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (SurePath™) as marker of cervical dysplasia and neoplasia*. **Diagn Cytopathol**. 2002;27(6):365-70.
43. Kruse AJ, Skaland I, Janssen EA, Buhr-Wildhagen S, Klos J, Arends MJ, et al. *Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability*. **Int J Gynecol Pathol**. 2004;23(2):100-9.
44. Maeda MY, Simoes M, Wakamatsu A, Longatto Filho AL, Oyafuso M, de Mello ES, et al. *Relevance of the rates of PCNA, Ki-67 and p53 expression according to the epithelial compartment in cervical lesions*. **Pathologica**. 2001;93(3):189-95.
45. Van de Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. *Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma*. **Gynecol Oncol**. 2004;92(1):40-6.
46. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. *p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study*. **Cancer Cytopathol**. 2011;119(3):158-66.
47. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. *Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population*. **Clin Cancer Res**. 2012;18(15):4154-62.
48. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. *The 2001 Bethesda System*. **JAMA**. 2002;287(16):2114-9.
49. Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, et al. *2011 Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy*. **Obstet Gynecol**. 2012;120(1):166-72.
50. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. *Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia*. **Am J Clin Pathol**. 2010;133(3):395-406.
51. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero*. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica, editor. **Rio de Janeiro: INCA**; 2011. 104 p.

52. Roche MTM Laboratories AG. CINtec PLUS®. *Cervical disease diagnostics*. [Internet]: Ventana Medical Systems, Inc.; [cited 10 de janeiro de 2012]; Available from: http://www.mtmlabs.com/eu/index.php?option=com_content&view=article&id=111&Itemid=214&lang=en.
53. Longatto Filho A, Silva TB, Rodrigues S, Haikel Jr RL. *Combined Screening for Breast and Gynecological Cancers Using Mobile Clinics: The Barretos Experience (Brazil)*. In: Shetty MK, editor. *Breast and Gynecological Cancers: An Integrated Approach for Screening and Early Diagnosis in Developing Countries*. **New York: Springer**; 2013. p. 189-200.
54. Mauad EC, Nicolau SM, Gomes UA, da Costa Vieira RA, de Castro Mattos JS, Longatto-Filho A, et al. *Can mobile units improve the strategies for cervical cancer prevention?* **Diagn Cytopathol**. 2010;38(10):727-30.
55. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. *Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities*. **J Natl Cancer Inst**. 2005;97(14):1066-71.
56. Einstein MH, Martens MG, Garcia FA, Ferris DG, Mitchell AL, Day SP, et al. *Clinical validation of the Cervista® HPV HR and 16/18 genotyping tests for use in women with ASC-US cytology*. **Gynecol Oncol**. 2010;118(2):116-22.
57. Fregnani JHT, Scapulatempo C, Haikel Jr RL, Sacchetto T, Campacci N, Mauad EC, et al. *Could Alarming High Rates of Negative Diagnoses in Remote Rural Areas Be Minimized with Liquid-Based Cytology? Preliminary Results from the RODEO Study Team*. **Acta Cytol**. 2012;57(1):69-74.
58. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand M-H, et al. *Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries*. **Vaccine**. 2008;26:K29-K41.
59. Schiffman M, Adriaenza E. *ASCUS-LSIL triage study*. **Acta Cytol**. 2011;44(5):726-42.
60. Waldstrøm M, Christensen RK, Ørnskov D. *Evaluation of p16INK4a/Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion*. **Cancer Cytopathol**. 2013;121(3):136-45.
61. Loghavi S, Walts AE, Bose S. *CINtec® PLUS dual immunostain: A triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion*. **Diagn Cytopathol**. 2013;41(7):582-7.

62. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, et al. *p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy.* **Gynecol Oncol.** 2012;126(2):198-202.

ANEXOS

Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidada a participar como voluntária do estudo intitulado:

“DETECÇÃO DE LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU EM MULHERES COM CITOLOGIA DE ASC-US E LIEBG: COMPARAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA DOS BIOMARCADORES P16/KI-67 E TESTE MOLECULAR DE DNA-HPV DE ALTO RISCO”

Que tipo de estudo é este e por que ele está sendo realizado?

Este estudo tem por objetivo avaliar as mulheres que apresentaram alterações vistas no exame preventivo do colo uterino (Papanicolaou) no intuito de se confirmar ou afastar a presença das chamadas lesões “precursoras” as quais podem em alguns casos futuramente levar ao câncer do colo do útero. Neste estudo as células alteradas serão melhor avaliadas através de um exame especial chamado de imunocitoquímica. Este trabalho está sendo realizado porque o câncer do colo uterino é uma doença ainda grave no Brasil e atinge milhares de mulheres todos os anos, sendo importante diagnosticá-lo precocemente para aumentar as suas chances de cura.

Eu sou obrigada a participar do estudo?

A decisão de participar do estudo é única e exclusivamente sua. Você pode desistir do estudo a qualquer momento, sem que isto atrapalhe seu direito de tratamento neste hospital. Se depois de receber todas as explicações e ler atentamente essa declaração você decidir participar do estudo, você ficará com uma cópia deste documento e deverá assinar uma via para indicar o seu consentimento.

Desconfortos, riscos e benefícios:

Caso você queira participar deste estudo, o seu médico irá fazer uma entrevista sobre seus hábitos e condições de vida que durará cerca de 5 minutos. Caso você se sinta

constrangida ao responder este questionário, você poderá interromper a entrevista a qualquer momento. Durante o exame físico (chamado de colposcopia) será necessária a introdução de um aparelho através da vagina (espéculo vaginal, também conhecido como “bico de pato”) para alcançar o colo do útero. Esse exame poderá causar em você um leve desconforto parecido com uma pressão na parte de baixo da barriga, lembrando que esse desconforto deve diminuir se você conseguir relaxar. Será coletado um pouco de secreção do colo uterino com uma escovinha. Em seguida poderá ser necessário retirar um pequeno fragmento do colo uterino (biópsia) o que poderá causar leve dor (semelhante a uma pequena cólica menstrual). Mas, se você preferir, o exame será parado imediatamente respeitando-se a sua vontade. Após a coleta do material com a escovinha ou mesmo após a realização da biópsia é comum a mulher apresentar um discreto sangramento vaginal que geralmente para em poucas horas.

Este estudo não trará qualquer risco a sua saúde e poderá, no futuro, beneficiar outras pessoas que apresentarem as mesmas alterações no exame de Papanicolaou que você.

Garantia de esclarecimento, liberdade de recusa e garantia de sigilo:

Você será esclarecida sobre esta pesquisa em tudo que desejar. Você é livre se quiser recusar participar deste estudo e poderá retirar o seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Isto não causará qualquer prejuízo no seu tratamento no Hospital de Câncer de Barretos.

Seu nome (ou qualquer outra informação que possa identificá-la) não será divulgado para ninguém e em nenhum momento. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no seu prontuário do Hospital de Câncer de Barretos, outra será fornecida a você.

Custos da participação, ressarcimento e indenização por eventuais danos:

A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira para você. No caso de a sua saúde sofrer algum dano decorrente deste estudo, o Hospital de Câncer de Barretos será responsável pelo seu atendimento e por seus cuidados. Não há indenização monetária para este estudo.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE:

Eu, _____ fui informada dos objetivos do estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. O Dr. JÚLIO CÉSAR POSSATI RESENDE (CRM-SP 133781) me explicou o estudo, respondeu minhas dúvidas e me certificou de que todos os dados desta pesquisa são confidenciais. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada oportunidade de ler e esclarecer a todas as minhas dúvidas.

Para sugestões, reclamações ou dúvidas, poderei contatar: 17-33216626, com Dr. Júlio César Possati Resende, pesquisador principal (ramal 7041) ou ainda através do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (ramal 6894).

Nome Voluntária

Ass. Voluntária

Data: ____/____/____

Nome Médico: JÚLIO CÉSAR POSSATI RESENDE

Ass. Médico

Data: ____/____/____

QUANDO ESSE TERMO FOR ASSINADO PELO REPRESENTANTE LEGAL, PRECISARÃO ASSINAR TAMBÉM DUAS TESTEMUNHAS.

Nome do representante legal (grau de parentesco)

Ass. Representante

Data: ____/____/____

Testemunha 1

Ass.

Data: ____/____/____

Testemunha 2

Ass.

Data: ____/____/____

Anexo B – Questionário padronizado

Questionário Padronizado

1	Identificação	
2	Nome	
3	Registro Hospitalar	
4	Cidade	
5	Data Admissão	DD-MM-AAAA
6	Data de nascimento	DD-MM-AAAA
7	Estado Civil	1- Solteiro; 2- Casado/União Estável; 3- Separado/Divorciado; 4- Viúva; 99- Ignorado
8	Cor	1- Branca; 2- Negra; 3- Amarela; 4- Parda; 99- Ignorado
9	Escolaridade	1- Analfabeto; 2- Ensino Fundamental Incompleto; 3- Ensino Fundamental Completo; 4- Ensino Médio Incompleto; 5- Ensino Médio Completo; 6- Ensino Superior Incompleto; 7- Ensino Superior Completo; 99- Ignorado
10	Número de Gestações	
11	Número de Partos Normais	
12	Número de Cesáreas	
13	Número de Abortos	
14	Menopausa	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
15	Menopausa – Idade	
16	Sexarca	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
17	Sexarca – Idade	
18	Menarca	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
19	Menarca – Idade	
20	Número de Parceiros Sexuais	
21	Há quanto tempo (anos) fez o último Exame Papanicolaou?	
22	Queixa Ginecológica	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado

23	Corrimento Vaginal	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
24	Prurido Vulvo-vaginal	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
25	Sangramento Genital Anormal	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
26	Dispareunia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
27	Lesões Genitais Verrucosas	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
CITOLOGIA DE CONVOCAÇÃO			
28	Data Citologia Alterada	DD-MM-AAAA	
29	Unidade de Coleta	2- T2; 3- T3; 4- T4; 5- T5; 6- B; 7- M; 8- C	
30	Epitélios Representados	1- Escamoso; 2- Escamoso, Glandular; 3- Escamoso, Metaplásico; 4- Escamoso, Glandular, Metaplásico	
31	Papanicolaou Inicial	1- ASC-US; 2- LIEBG	
32	Colposcopia	0- Insatisfatória (inadequada); 1- Satisfatória (adequada)	
33	Avaliação Colposcópica	0- Não é possível avaliar; 1- Alterações benignas, cervicite; 2- LIEBG; 3- LIEAG; 4- Lesão Invasiva	
34	Citologia da Colpo	0- Negativo para Neoplasia; 1- ASC-US; 2- ASC-H; 3- Células Glandulares Atípicas de Significado Indeterminado – Possivelmente Não-neoplásicas; 4- Células Glandulares Atípicas de Significado Indeterminado – Não se pode afastar lesão de alto grau; 5- Células Atípicas de Origem Indefinida – Possivelmente Não-neoplásicas; 6- Células Atípicas de Origem Indefinida – Não se pode afastar lesão de alto grau; 7- LIEBG; 8- LIEAG; 9- LIEAG, não podendo excluir microinvasão; 10- Carcinoma Epidermóide Invasor; 11- Adenocarcinoma “in situ”; 12- Adenocarcinoma Invasor Cervical; 13- Adenocarcinoma Invasor Endometrial; 14- Adenocarcinoma Invasor Sem Outras Especificações; 15- Outras_____	
35	Laudo Histológico	1- Alterações benignas, cervicite; 2- Neoplasia intraepitelial de baixo grau; 3- Neoplasia intraepitelial de alto grau – NIC II; 4- Neoplasia intraepitelial de alto grau – NIC III; 5- Adenocarcinoma “in situ”; 6- Carcinoma epidermóide invasivo; 7- Adenocarcinoma invasivo; Inconclusivo, material insuficiente; 8- Outros_____	

Anexo C – Parecer do comitê de ética em pesquisa da Fundação Pio XII



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO DE LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU EM MULHERES COM CITOLOGIA DE ASC-US E LIEBG: COMPARAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA DOS BIOMARCADORES P16/Ki-67 E TESTE MOLECULAR DE DNA-HPV DE ALTO RISCO

Pesquisador: Júlio César Possati Resende

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 03113712.5.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: PRODUTOS ROCHE QUIMICOS E FARMACEUTICOS S A

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 512.674

Data da Relatoria: 17/01/2014

Apresentação do Projeto:

A presente EMENDA trata-se de um Comunicado de Alteração do Título do Estudo Supracitado.

Objetivo da Pesquisa:

Comunicar a alteração feita do título do Estudo Supracitado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários e considerações adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

- Nova Folha de Rosto com Título Alterado;
- Novo Projeto Detalhado com Título Alterado;
- Carta explicando os motivos para Alteração do Título do Estudo;

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS



Continuação do Parecer: 512.674

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências e/ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 608/2012, e:

- Aprovou a Emenda com Alteração do Título do Estudo Supracitado, submetido em 13/01/2014;

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios parciais previstos para IMEDIATAMENTE, pois o pesquisador deve relatórios a este Comitê desde Setembro/2012.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



FUNDAÇÃO PIO XII -
HOSPITAL DE CÂNCER DE
BARRETOS



Continuação do Parecer: 512.674

BARRETOS, 21 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Sergio Vicente Serrano
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br