

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**PROEX C PARA O DIAGNÓSTICO DE LESÕES INTRA-
EPITELIAIS NO COLO DO ÚTERO**

Andressa de Azambuja Pias Weber

Orientadora: Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Dissertação de Mestrado

2012

Andressa de Azambuja Pias Weber

**PROEX C PARA O DIAGNÓSTICO DE LESÕES INTRA-
EPITELIAIS NO COLO DO ÚTERO**

Dissertação de Mestrado apresentado
ao programa de Pós- Graduação em
Medicina: Ciências Médicas da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, para a obtenção do título de
Mestre em Medicina: Ciências
Médicas.

Orientadora: Dra. Maria Isabel Albano
Edelweiss

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

de Azambuja Pias, Andressa

ProEx C para o diagnóstico de Lesões Intra-epiteliais no colo do Útero / Andressa de Azambuja Pias. -- 2012.

94 f.

Orientadora: Maria Isabel Albano Edelweiss.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Neoplasia intra-epitelial cervical. 2. Citologia e patologia. 3. metanálise. 4. ProEx C. 5. Revisão Sistemática. I. Albano Edelweiss, Maria Isabel, orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Inês Rosa, coordenadora e professora do curso de graduação em Medicina e professora e orientadora do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, responsável pelo laboratório de Epidemiologia da UNESC.

Profa. Dra. Daniela Dornelles Rosa, médica oncologista do Hospital Fêmeina, Grupo Hospitalar Conceição e do Hospital Moinhos de Vento.

Prof. Dr. Ricardo dos Reis, professor Adjunto do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela oportunidade de realizar o programa em uma Universidade pública.

Aos professores do PPG, pelos ensinamentos recebidos.

À minha orientadora Dra. Maria Isabel Edelweiss por ter aberto as portas que me levaram a realização deste trabalho, pela proposta, pelo apoio incansável e pela presença constante.

À Dra. Lidia Rosi Medeiros por acreditar no projeto, pela generosidade com seus conhecimentos e pelo carinho.

Às minhas amigas e colegas de aula, Guísella e Bruna, pelos tantos bons momentos em aula que passamos juntas.

Aos colegas do Laboratório Weinmann, pelo apoio e compreensão, principalmente a toda a equipe do Setor de Hematologia, pela paciência pelas constantes trocas de horário, pela amizade e carinho.

Aos meus amigos, pela compreensão e apoio.

*“ O mundo está nas mãos daqueles que tem a
coragem de sonhar e de correr o risco
de viver seus sonhos. “*

(Paulo Coelho)

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Naury e Maria Alcina, pelo incentivo a educação, por acreditarem em mim, e por me transmitirem muito amor e paz.

Aos meus irmãos Tielle e Rodrigo, pelo carinho, amor e amizade em todos os momentos.

À minha avó Dorothy, por me transmitir sempre muita calma, paciência e confiança.

Ao meu marido Tiago, por estar sempre ao meu lado, pelo amor, paciência, incentivo e senso de humor nos momentos difíceis.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	8
Lista de Tabelas.....	9
Lista de Figuras.....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	12
Apresentação.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1 Papilomavírus Humano (HPV).....	17
1.1.1 Epidemiologia.....	17
1.1.2 Patogenia da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV).....	18
1.1.3 Estrutura Viral.....	22
1.1.4 Classificação do Papilomavírus Humano.....	24
1.1.5 Fatores de Risco.....	27
1.1.5.1 Uso de anticoncepcional oral.....	27
1.1.5.2 Paridade.....	28
1.1.5.3 Tabagismo.....	28
1.1.5.4 Imunossupressão.....	29
1.1.5.5 Deficiências nutricionais.....	30
1.2 Biomarcadores.....	31
1.3 Métodos de Diagnóstico.....	33
1.3.1 Exame Citopatológico.....	33
1.3.2 Exame Colposcópico.....	34
1.3.3 Exame Histopatológico.....	35
1.3.4 Exame Imuno-Histoquímico.....	36
OBJETIVOS.....	37
REFERENCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	38
ARTIGO CIENTÍFICO.....	50
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES.....	75
ANEXOS.....	76

Lista de Abreviaturas e Siglas

CDKs: quinases dependentes de ciclinas

DNA: ácido desoxirribonucléico

DST: Doença sexualmente transmissível

E: região precoce

E6-AP: E6 *associated protein ligase*

HPV: Papilomavírus Humano

HSIL: lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (*High Squamous Intraepithelial Lesion*)

ICTV: International Committee on Taxonomy of Virus

IFCPC: *International Federation of Cervical Cancer*

ISM: hibridização in situ

L: região tardia

LCR: região longa de controle

LSIL: lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (*Low Squamous Intraepithelial Lesion*)

MCM2: proteína manutenção minichromosome 2

NCR: região não codante

NIC: Neoplasias intraepitelial cervical

PCR: reação em cadeia da polimerase

ProEx C: TriPath Imaging, Burlington, NC

Rb: retinoblastoma

RNA: ácido riconucléico

pRb : proteína do retinoblastoma

SIL: lesão intra-epitelial escamosa (*Squamous Intraepithelial Lesion*)

TOP2A : topoisomerase II- α

Lista de Tabelas

Revisão da literatura

Tabela 1: Funções dos genes do papiloma vírus humano.....23

Tabela 2: Classificação epidemiológica e filogenética dos HPVs anogenitais..26

Artigo científico

Table 1: Participant characteristics and scoring criteria in studies included.....67

Table 2: Results of the evaluation of each study according to QUADAS.....68

Table 3. Summary of positive likelihood ratios (random effects model).....69

Table 4: ProEx C according to diagnosis in Biopsy Results in Women with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance or more in Cytology...70

Table 5: Accuracy of the biomarker ProEx C in patients with ASC-US, ASC-H and SIL vs positive or negative biopsy.....71

Lista de Figuras

Revisão da literatura

Figura 1: Etapas do ciclo celular do HPV.....	20
Figura 2: Patogenia da infecção pelo HPV.....	21
Figura 3: Representação esquemática do genoma do HPV.....	23
Figura 4: Árvore filogenética mostrando os tipos de HPV identificados até 2004.....	25

Artigo científico

Figure 1: Study selection process.....	72
Figure 2: Forest plot of sensitivity.....	73
Figure 3: Forest plot of specificity.....	73
Figure 4: ROC curve of ASC–US or more, with 95%CI.....	74

RESUMO

Foi realizada uma análise quantitativa sistemática da literatura para verificar a acurácia do biomarcador ProEx C em pacientes com ASC-US, ASC-H e SIL. **Metodologia:** A pesquisa foi realizada no MEDLINE (PubMed e OVID), EMBASE, LILACS, IBECs, BIOSIS, Web of Science, SCOPUS, desde 1966 até Novembro de 2011. Esta revisão esteve centrada em estudos que cumpriram as três condições para a seleção do estudo, que incluem teste de Papanicolaou, teste de triagem ProEx C e histopatologia como o teste de referência. **Resultados:** Cinco estudos, incluindo 713 mulheres, foram analisados. Das biópsias positivas, 83% (355/429) foram positivas para ProEx C, enquanto 14% (41/284) das biópsias negativas foram positivas para ProEx C. A sensibilidade combinada foi de 83% (95% IC, 79-87) e especificidade foi de 85% (95% IC, 80-89) usando o software Meta-Disc. Para lesão cervical vs biópsia positiva ou negativa, a área sob a curva (AUC) foi de 0,90 com valor do ponto Q * de 0,84. **Conclusão:** nossos dados concordam com a hipótese de que ProEx C representa um evento precoce na carcinogênese cervical e que poderiam estar associados com a iniciação e progressão de lesões cervicais e, se expressados nos exames estudados podem revelar maior acurácia diagnóstica destes exames.

Palavras-chave: neoplasia intra-epitelial cervical, citologia e patologia, meta-análise, revisão sistemática, ProEx C, anticorpo monoclonal, imunohistoquímica.

ABSTRACT

Undertook a quantitative systematic review of the literature to ascertain the accuracy of the biomarker ProEx C in patients with ASC-US, ASC-H and SIL. **Methods:** A comprehensive search of the MEDLINE (PubMed and OVID interface), EMBASE, LILACS, IBECs, BIOSIS, Web of Science, SCOPUS, index from 1966 to November 2011. This review focused on studies that fulfill the three mandatory conditions for study selection that include Pap Test, triage testing ProEx C and histopathology like the reference test. **Results:** Five studies, including 713 women, were analyzed. 83% (355/429) of positive biopsy were positive for ProEx C activity, while 14% (41/284) of the negative biopsy were positive for ProEx C activity. Pooled sensitivity was 83% (95% IC, 79 to 87) and specificity was 85% (95% IC, 80-89) using software Meta-Disc. For cervical lesion vs positive or negative biopsy, the area under the curve (AUC) was 0.90 with Q* point value of 0.84. **Conclusion:** our data agree with the hypothesis that ProEx C represents an early event in cervical carcinogenesis that could be associated with the initiation and progression of cervical lesions and is expressed in the studied tests may reveal greater diagnostic accuracy of these tests.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia, cytology and pathology, meta-analysis, systematic review, ProEx C, monoclonal antibody immunohistochemistry.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste na dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 2012, sendo um estudo de revisão sistemática com enfoque diagnóstico do biomarcador ProEx C para o diagnóstico de Lesões Intra-Epiteliais no Colo do útero.

A revisão de literatura foi dividida em três partes: (1) revisão sistemática; (2) revisão sistemática com enfoque diagnóstico; (3) biomarcador ProEx C. Os resultados são apresentados na forma de artigo, analisando, através de uma metanálise, a acurácia diagnóstica do biomarcador ProEx C. As considerações finais discutem os principais achados do artigo.

Documentos de apoio estão apresentados na forma de Anexos, incluindo o Protocolo encaminhado para a Cochrane, cujo título já foi aprovado pela revista e está na fase de análise final para a publicação do protocolo (Anexo A).

INTRODUÇÃO

O câncer cervical representa um problema de saúde pública, tendo em vista que é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo (CURRIN *et al.*, 2009; GARCIA -PINERIS *et al.*, 2009). No Brasil, em 2010, estimou-se 18.430 mil novos casos de câncer do colo do útero a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2009).

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) ocorre freqüentemente entre indivíduos jovens e sexualmente ativos e, acredita-se que cerca de 75 a 80% da população será infectada durante alguma fase de sua vida (NADAL *et al.*, 2006 WEAVER *et al.*, 2006; WILEY *et al.*, 2006, COX *et al.*, 2006).

A maioria das lesões está relacionada com quatro tipos de HPVs: 6 e o 11 são responsáveis pelas lesões de baixo grau e 90% das verrugas anogenitais, e os tipos 16 e 18 provocam 70% das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) de alto grau e o câncer cervical invasivo (NADAL *et al.*, 2006; WILEY *et al.*, 2006; FERRIS *et al.*, 2006).

Atualmente, sabe-se que a infecção pelo HPV é necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical, pois o risco consiste no fato de a infecção, com um tipo de HPV oncogênico, persistir, aliado a alguns co-fatores (SOUZA *et al.*, 2008). Dentre alguns fatores que contribuem na evolução da neoplasia cervical temos a paridade, uso de contraceptivos orais, tabagismo, imunossupressão e deficiências nutricionais (ROSA *et al.*, 2009). Existem ainda alguns fatores que contribuem para a progressão da infecção pelo HPV, que estão ligados ao processo de aquisição do HPV, que não são considerados co-fatores, como por exemplo a idade da sexarca, número de parceiros sexuais e história de doença sexualmente transmissível (DST) (ROSA *et al.*, 2009).

Um biomarcador é um marcador molecular biológico que serve como indicador de processos biológicos normais ou patogênicos, além disso, ajuda a avaliar a resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (LARI *et al.*, 2011; BUHMEIDA *et al.*, 2011). Nas neoplasias os biomarcadores podem ser usados para ajudar no diagnóstico da doença, detecção do estadiamento,

monitoramento da resposta à terapia e previsão de prognóstico do paciente (LARI *et. al.*, 2011; KELLY *et. al.*, 2006).

Em lesões cervicais pré- cancerosas, a principal preocupação é de prever o progresso da lesão (GUPTA *et. al.*, 2010). Os biomarcadores permitem o monitoramento de eventos moleculares essenciais em amostras histológicas ou citológicas e são susceptíveis de melhorar a detecção de lesões que têm um alto risco de progressão em ambas as configurações de rastreio primário e de triagem (GUPTA *et. al.*, 2010).

Um biomarcador que está sendo estudado é o TriPath Imaging, Burlington, NC (ProEx C), que tem um valor preditivo positivo mais elevado em comparação com p16 , e consiste em um coquetel imunocitoquímico de um anticorpo contra a topoisomerase II- α (TOP2A) e dois anticorpos contra a proteína manutenção minichromosome 2 (MCM2) (SIDDIQUI *et. al.*, 2008 ; GUPTA *et. al.*, 2010; BECCATI *et. al.*, 2008).

A citologia pode proporcionar uma excelente sensibilidade para a detecção de lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL) e alguns casos de lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL). No entanto, resultados falso-negativos dos testes de Papanicolaou têm sido relatados em até 30% dos casos. Digene Captura Híbrida HPV teste (Digene Corp, Gaithersburg, MD) que oferece uma alta sensibilidade para a detecção de HPV no diagnóstico de lesão intra epitelial escamosa (SIL), mas a taxa de falso-positivo chega a 27% (SHI *et. al.*, 2007). Além disso, a biópsia do colo do útero é freqüentemente realizada de forma mais precisa, e classifica a lesão escamosa e o carcinoma invasivo (SHI *et. al.*, 2007). Infelizmente, os critérios histopatológicos não são totalmente confiáveis para diagnosticar e classificar SILs por causa da presença de condições que podem sugerir, como atipia reativa, atrofia e metaplasia escamosa imatura (SHI *et. al.*, 2007).

No entanto, Proex-C pode ser usado como uma alternativa aos testes HPV, porque a sensibilidade para a detecção de neoplasia intra-epitelial cervical NIC II usando ProEx C pode chegar a 99% em alguns estudos (OBERG *et. al.*, 2010). Como um marcador também permitiria identificar as células que sofreram transformação neoplásica e não simplesmente os efeitos citopáticos da presença viral (KELLY *et. al.*, 2006).

Pretende-se, com esse estudo, fazer uma revisão sistemática da acurácia (sensibilidade e especificidade) de biomarcador ProEx C em mulheres com diagnóstico de ASC-US, LSIL, HSIL em exame de Papanicolau ou citologia em base líquida com colposcopia anormal, que tinha concomitantemente biópsia cervical.

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Papilomavírus Humano (HPV)

1.1.1 Epidemiologia

O câncer cervical representa um problema de saúde pública, tendo em vista que é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo (CURRIN *et al.*, 2009; GARCIA-PINERIS *et al.*, 2009). Apesar de existirem estratégias eficazes para sua prevenção, aproximadamente 371.200 novos casos de câncer do colo do útero são registrados a cada ano em todo mundo (RAMA *et al.*, 2008).

As maiores incidências de câncer de colo do útero ocorrem na América Central (44,44/100.000), em algumas partes da Ásia (43,40/100.000) e no sul da África (40,44/100.000) (RAMA *et al.*, 2008). A América Latina apresenta uma alta incidência, variando de 31,79/100.000 mulheres no norte e 27,69/100.000 mulheres no sul do continente (RAMA *et al.*, 2008). No Brasil, em 2010, estimou-se 18.430 mil novos casos de câncer do colo do útero a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2009).

A infecção pelo HPV ocorre freqüentemente entre indivíduos jovens e sexualmente ativos e, acredita-se que cerca de 75 a 80% da população será infectada durante alguma fase de sua vida, sendo que metade dos novos casos acontece nos três primeiros anos de atividade sexual (NADAL *et al.*, 2006; WEAVER *et al.*, 2006; WILEY *et al.*, 2006, COX *et al.*, 2006).

O HPV apresenta dois picos de prevalência, sendo um mais elevado em mulheres jovens, o qual apresenta queda gradual com a idade, e outro entre a quarta e quinta décadas (NADAL *et al.*, 2006; FRANCO *et al.* , 2001; FRANCO *et al.*, 2005; BOSCH *et al.*, 2002). Estudos mostram que o segundo pico representa a perda da imunidade original contra o vírus ao qual esteve exposta em idade mais jovem (NADAL *et al.*, 2006; FRANCO *et al.* , 2005; FRANCO *et al.*, 2001; BOSCH *et al.*, 2002). A grande maioria das infecções cede espontaneamente, a ponto de não ser detectada nem com os métodos mais sensíveis (NADAL *et al.*, 2006; FRANCO *et al.* , 2005; FRANCO *et al.*, 2001;

BOSCH *et al.*, 2002). No entanto, a preocupação dá-se com as infecções persistentes, determinadas pelos HPV oncogênicos, que aumentam o risco da neoplasia intraepitelial e do câncer (NADAL *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2005; FRANCO *et al.*, 2001; BOSCH *et al.*, 2002).

A maioria das lesões está relacionada com quatro tipos de HPVs: 6 e o 11 que são responsáveis pelas LSIL e 90% das verrugas anogenitais, e os tipos 16 e 18 que provocam 70% das HSIL e o câncer cervical invasivo (NADAL *et al.*, 2006; WILEY *et al.*, 2006; FERRIS *et al.*, 2006).

1.1.2 Patogenia da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV)

O vírus do HPV apresenta um tropismo celular, devido a receptores específicos, cuja replicação é limitada a células de tecidos em diferenciação (ROSA *et al.*,2009). Sendo assim, acredita-se que a infecção pelo vírus do HPV inicia-se nas células basais ou parabasais do epitélio cervical metaplásico, na junção escamo-colunar entre o epitélio colunar da endocérvice e o epitélio escamoso da ectocérvice, e o vírus penetra via mucosa lesada, após ganhar acesso via corte ou abrasão da mucosa ou, a algum trauma decorrente do intercuro sexual (BURD *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*,2007; ROSA *et al.*,2009; MOODY *et al.*,2009). O vírus pode se replicar nas camadas proliferativas e expressar suas proteínas, no entanto, a síntese de proteínas do capsídeo e a montagem de partículas virais, só têm lugar nas células mais indiferenciadas (ROSA *et al.*,2009).

Nas lesões benignas, o genoma viral do HPV encontra-se separado do ácido desoxirribonucléico (DNA) celular, surgindo como um plasmídeo extra-cromossômico (corpo epissomal) (ROSA *et al.*,2009; KAUFMAN *et al.*, 2000; BURD *et al.*, 2003). Nas lesões malignas, o DNA viral se integra aos cromossomos do hospedeiro, e para que isso ocorra é necessário que haja uma quebra no genoma viral, ocorrendo na maioria das vezes nas regiões E1 e E2 do vírus (ROSA *et al.*,2009; JEON *et al.*, 1995). A integração do DNA viral acarreta em alteração na regulação da expressão dos oncogenes virais E7 e E6, que podem exercer seus efeitos, interferindo nas proteínas que regulam o crescimento celular, causando uma proliferação descontrolada, e, sendo assim,

umentando o risco de progressão das lesões intra-epiteliais cervicais (BEHAR *et al.*,2008; KADAJA *et al.*,2009).

Para a produção de vírions infectantes, estes devem replicar seu genoma e empacotá-lo em partículas (DOORBAR *et. al.*, 2005). Esse processo ocorre nas células das camadas média ou superficial do epitélio, após aumento na atividade do promotor tardio (DOORBAR *et. al.*, 2005). A etapa de replicação ocorre em células em proliferação e requer a expressão de E4 e E5, cujas funções na replicação não estão bem definidas (DOORBAR *et. al.*, 2005). A ligação de E2 à região regulatória do DNA viral é necessária para que ocorra a replicação viral e recrutamento da proteína E1, que atua como uma helicase, na origem da replicação (DOORBAR *et. al.*, 2005). Assim, ocorre a replicação do DNA viral nas camadas basais e parabasais, seguida da montagem do capsídeo viral nas camadas mais superiores do epitélio (DOORBAR *et. al.*, 2005).

Para a síntese viral ser concluída, o vírus do HPV codifica as duas proteínas estruturais, L1 e L2, as quais são expressas nas camadas superiores do epitélio (DOORBAR *et. al.*, 2005). Assim, são formadas partículas virais que são liberadas somente quando as células infectadas alcançam a superfície do epitélio, uma vez que o HPV não possui ciclo lítico (DOORBAR *et. al.*, 2005). A Figura 1 ilustra os principais estágios do ciclo celular do HPV.

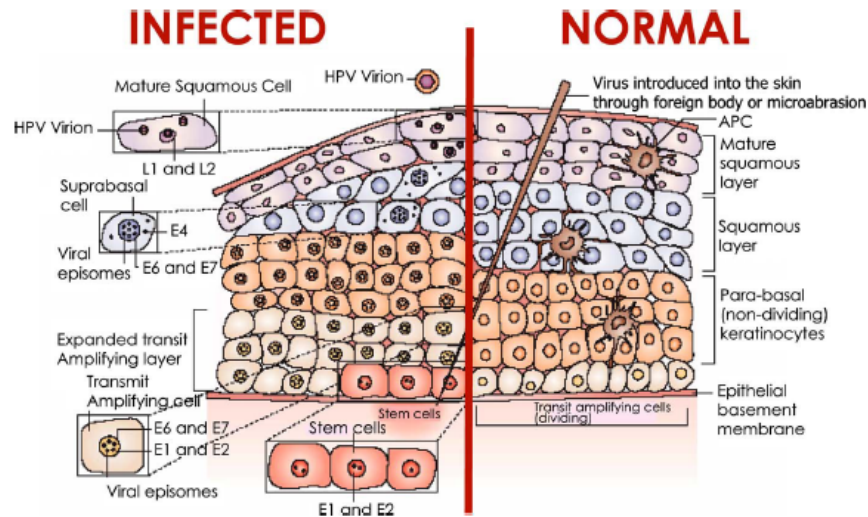


Figura 1: Etapas do ciclo celular do HPV. Fonte: MUÑOZ et al, 2006.

A ativação e inativação de várias ciclinas-quinases dependentes, são responsáveis pela regulação do ciclo celular, sendo vários os pontos de controle ao longo do ciclo para checar a existência de algum dano celular que possa comprometer a síntese de DNA (BEHAR *et al.*,2008). Sendo assim, a célula pode ser levada a apoptose (morte celular programada) ou mantida no ciclo celular (BEHAR *et al.*,2008)

A proteína E6 se liga à proteína supressora de tumor p53, formando o complexo com a proteína E6 *associated protein ligase* (E6-AP), estimulando a degradação proteolítica da p53 pelo caminho ubiquitina-dependente, diminuindo os níveis de p53 nas células infectadas fazendo com que as células destes tumores falhem na parada do ciclo celular em G1, seguindo-se então o dano no DNA celular (PEREIRA *et al.*,2007; ROSA *et al.*,2009). A E6 inibe a apoptose, através de uma interação até a degradação da proteína Bak, uma proteína pró-apoptótica expressa em altos níveis nas camadas superiores do epitélio diferenciado (PEREIRA *et al.*,2007; ROSA *et al.*,2009). Sugere-se também que a proteína E6 contribua para a imortalização das células, por induzir a atividade da telomerase, ativando o promotor da telomerase transcriptase reversa sendo um importante fator no desenvolvimento do câncer cervical (PEREIRA *et al.*,2007; ROSA *et al.*,2009).

A proteína E7 é uma pequena fosfoproteína nuclear, que tem meia-vida curta e é rapidamente degradada por um mecanismo envolvendo a conjugação de ubiquitina no domínio amino terminal (PEREIRA *et al.*,2007; ROSA *et al.*,2009). É constituída por três regiões conservadas (CR1, CR2 e CR3), e encontra-se no citoplasma, apesar de exercer sua atividade biológica no núcleo (PEREIRA *et al.*,2007; ROSA *et al.*,2009). A participação da proteína E7 na oncogênese induzida por HPV é devido a sua capacidade de ligar-se a proteína do retinoblastoma (pRb), que normalmente previne a célula da entrada no ciclo celular e regula a transição G1/S (PEREIRA *et al.*,2007; ROSA *et al.*,2009). A ligação ocorre preferencialmente à pRb hipofosforilada, ativando fatores de transcrição E2F, induzindo a transcrição de genes importantes no controle da divisão celular por promover a progressão do ciclo celular, atuando nas fases G1 e S, resultando em proliferação celular anormal (PEREIRA *et al.*,2007; ROSA *et al.*,2009).

A proteína p53 atua no ciclo celular nos pontos de controle G1/S e G2/M, levando a uma parada nesses pontos e permitindo o reparo de possíveis danos no DNA. A parada no ciclo celular em G1, após a ativação da p53, envolve a transcrição do gene codificante da proteína p21/ WAF inibidora de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (ROSA *et al.*,2009). A Figura 2 ilustra a Patogênese da infecção pelo HPV.

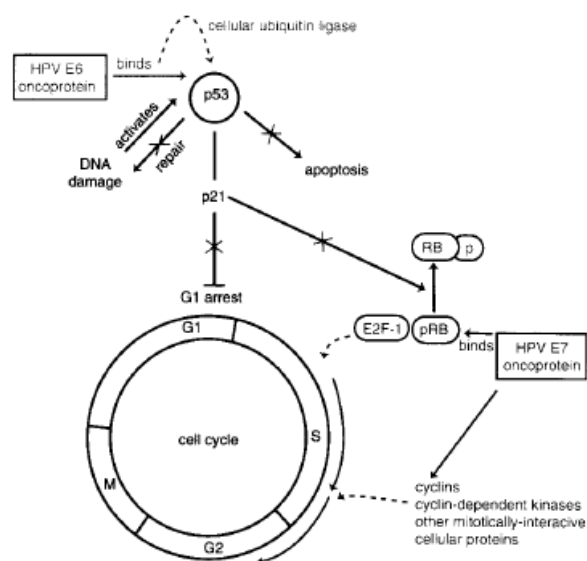


Figura 2: Patogênese da infecção pelo HPV. Fonte: BURD *et al.*,2003.

A história natural do câncer cervical é um processo contínuo e gradual progredindo de LSIL para lesões mais severas como HSIL e finalmente para doença invasiva (BURD *et. al.*, 2003). Alguns autores sugerem que as lesões LSIL e HSIL possam ser processos distintos, com LSIL indicando uma infecção auto-limitada e HSIL como precursor do câncer cervical (BURD *et. al.*, 2003). O risco de progressão da displasia leve para moderada é de 1% ao ano, enquanto que de moderada para severa é de 16% em 2 anos e 25% em 5 anos (BURD *et. al.*, 2003). Evidentemente que a identificação e o tratamento do HPV nos estágios iniciais bloqueiam o processo evolutivo (BURD *et. al.*, 2003).

1.1.3 Estrutura Viral

Atualmente, segundo a International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV), o HPV está classificado na família *Papillomaviridae* (antiga Papovaviridae), gênero *papovavírus* (ROSA *et al.*, 2009). Os HPVs são vírus de DNA não envelopados, com cerca de 55nm de diâmetro, compostos por uma dupla hélice de DNA circular, com aproximadamente 7,9 Kb (WANG *et al.*, 2009; PYEON *et al.*, 2009).

O genoma do HPV é dividido em regiões: uma região longa de controle (LCR) e as regiões precoce (E) e tardia (L) (PEREIRA *et al.*, 2007). A LCR, é também conhecida como região não codante (NCR), e está situada entre o fim de L1 e o começo de E6 (Figura 3). É a região reguladora que contém a origem de replicação e a maioria dos promotores de transcrição, sendo que a perda desse mecanismo intracelular de inspeção, contribui na progressão para a malignidade, correlacionando-se com a abundante expressão gênica viral (PEREIRA *et al.*, 2007, ROSA *et al.*, 2009). A região E compreende cerca de 45% do genoma viral e, codifica proteínas envolvidas na conservação do genoma, replicação do DNA e ativação do ciclo lítico, subdivide-se em E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (PEREIRA *et al.*, 2007, ROSA *et al.*, 2009). A região L representa aproximadamente 40% do genoma, e codifica as proteínas do capsídeo (L1 e L2), responsáveis pelas etapas finais da replicação do vírus, como a síntese de proteínas estruturais do capsídeo (PEREIRA *et al.*, 2007, ROSA *et al.*, 2009). A função dessas proteínas estão resumidas na Tabela 1.

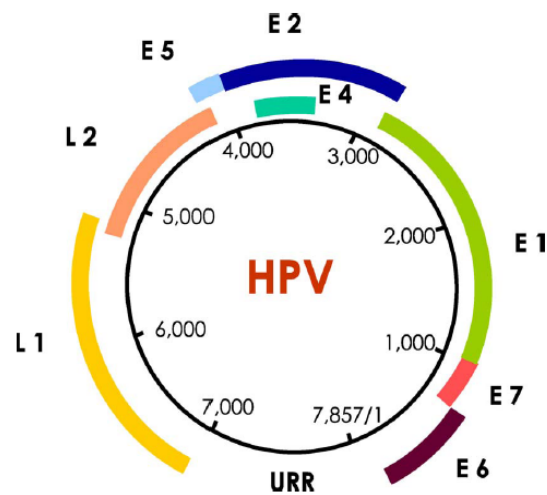


Figura 3: Representação esquemática do genoma do HPV. Fonte: Munõz *et. al.* 2006.

Tabela 1: Funções dos genes do papiloma vírus humano

Gene	Função
E1	Atividade de DNA helicase, ligação de ATP DNA dependente, atividade de ATPase. Papel na replicação e na repressão da replicação.
E2	Regulador da transcrição e replicação viral, controle da região de expressão precoce (<i>Early</i>), necessária para replicação viral eficiente junto com E1.
E3	Sem função conhecida (presente apenas em uma minoria de papiloma vírus).
E4	Expresso primariamente em epitélio em diferenciação, associado ao citoesqueleto de queratina de células epiteliais em cultura. Papel na liberação de vírus.
E5	Atividade de transformação em HPV16 <i>in vitro</i> . Possivelmente estimula o início da proliferação celular <i>in vivo</i> , mas pode ter um papel na iniciação da carcinogênese.
E6	Papel no processo de transformação junto com E7. Propriedades de ativação transcripcional. E6 dos HPVs de alto risco inativa p53 através de degradação rápida através da via da ubiquitina. ¹⁸ Junto com E7 propicia um ambiente celular para a replicação viral.
E7	Induz síntese de DNA em células em repouso. E7 se liga à forma hipo-fosforilada da proteína do retinoblastoma (pRb), resultando em sua inativação funcional permitindo progressão funcional para a fase S do ciclo celular. Proteína E7 dos tipos de baixo risco HPVs 6 e 11 se liga menos eficientemente do que a proteína E7 dos tipo de alto risco HPVs 16 e 18.
E8	Sem função conhecida (presente apenas em uma minoria dos papilomas vírus).
L1	Proteína maior do capsídeo (expressão tardia, <i>Late</i>).
L2	Proteína menor do capsídeo.

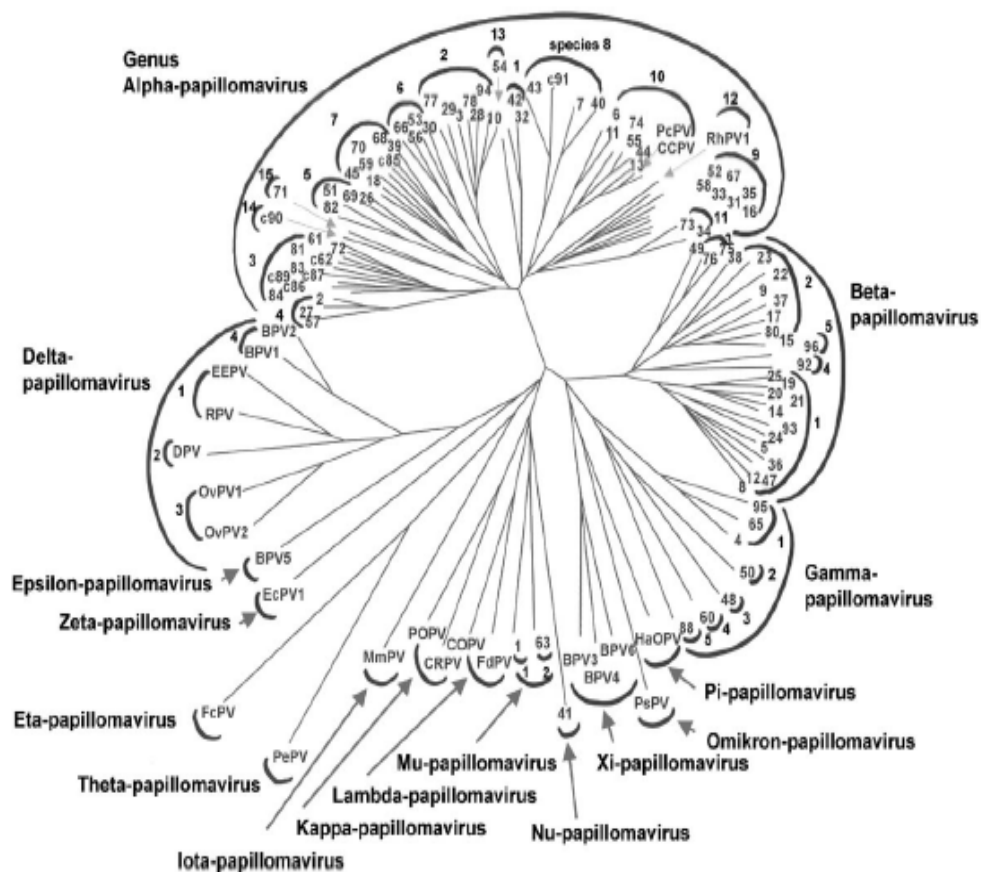
Fonte: Rivoire *et. al.*, 2006

1.1.4 Classificação do Papilomavírus Humano

O HPV é o agente etiológico central para o desenvolvimento do câncer cervical, sendo encontrado em 99,7% dos casos desse tipo de câncer (CURRIN *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2007). A transmissão do HPV ocorre por contato direto dos órgãos genitais durante a prática sexual, relações anais, que podem resultar em infecções virais e neoplasias anais, e ocasionalmente pelo contato oral (ROSA *et al.*, 2009).

Atualmente, são conhecidos mais de 230 tipos de HPV com base na seqüência do DNA viral, destes 118 genótipos estão bem caracterizados de acordo com o nicho biológico, potencial oncogênico e posição filogenética, sendo que 40 destes infectam o trato anogenital (Figura 4) (HAWS *et al.*, 2004; VILLIERS *et al.*, 2004). Em lesões benignas, o DNA do HPV replica-se na forma episossomal, ou seja, de forma não integrada ao genoma da célula hospedeira, e esses HPVs com baixo risco de malignidade incluem os tipos HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81. No câncer cervical, o genoma do HPV está integrado ao DNA da célula, tendo um alto risco de malignidade, incluindo os tipos HPV- 16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56-58-59-68-73-82 (PEREIRA *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2009; MUNOZ *et al.*, 2003).

Figura 4: Árvore filogenética mostrando os tipos de HPV identificados até 2004.
 Fonte: de VILLIERS *et al.*, 2004.



De acordo com a homologia na sequência de DNA e a associação com as lesões clínicas, os HPVs podem ser agrupados inicialmente em tipos cutâneos e mucosos (GROSS *et al.*, 1999). Os HPVs anogenitais são classificados no gênero *Alphapapillomavirus*, o qual é primariamente mucosotrópico, embora contenha alguns tipos cutâneos; os vírus desse grupo compartilham certas características comuns (CHAN *et al.*, 1995; VILLIERS *et al.*, 2004, THOMISSON *et al.*, 2008). Os tipos mucosotrópicos infectam mucosas

e são classificados em alto e baixo risco de acordo com sua relação com lesões proliferativas benignas ou malignas (MCMURRAY *et al.*,2001; OLIVEIRA *et al.*,2008; SCHEURER *et al.*,2005; STOLER *et al.*, 2003). A classificação epidemiológica e filogenética dos HPVs anogenitais estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação epidemiológica e filogenética dos HPVs anogenitais

HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK	HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK	HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK
9	HPV 52	High	10	HPV 6	Low	4	HPV 57	Undetermined
	HPV 67	Undetermined		HPV 11	Low		HPV 2a	Undetermined
	HPV 33	High		HPV 13	Low		HPV 27	Undetermined
	HPV 58	High		HPV 74	Undetermined	15	HPV 71	Undetermined
	HPV 16	High		HPV 44	Low		HPV 90	Undetermined
	HPV 31	High		HPV 55	Undetermined	3	HPV 61	Low
	HPV 35	High		8	HPV 91		Undetermined	HPV 72
11	HPV 34	Undetermined	HPV 7		Undetermined		HPV 62	Undetermined
	HPV 73	Probably high	HPV 40		Low		HPV 81	Low
7	HPV 59	High	1		HPV 32		Undetermined	HPV 83
	HPV 18	High		HPV 42	Low		HPV 89	Low
	HPV 45	High	13	HPV 54	Low	HPV 84	Undetermined	
	HPV 70	Low				HPV 86	Undetermined	
	HPV 39	High				HPV 87	Undetermined	
	HPV 68	Probably high				2	HPV 28	Undetermined
HPV 85	Undetermined	HPV 3	Undetermined					
5	HPV 26	Probably high	6	HPV 53	Probably high	HPV 10	Undetermined	
	HPV 69	Undetermined		HPV 56	High	HPV 29	Undetermined	
	HPV 51	High		HPV 66	Probably high	HPV 77	Undetermined	
	HPV 82	Probably high						

Fonte: MUNOZ et al, 2006.

1.1.5 Fatores de Risco

Atualmente, sabe-se que a infecção pelo HPV é necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical, pois o risco consiste no fato de a infecção, com um tipo de HPV oncogênico persistir, aliado a alguns co-fatores (SOUZA *et al.*, 2008). Dentre alguns fatores que contribuem na evolução da neoplasia cervical temos a paridade, uso de contraceptivos orais, tabagismo, imunossupressão e deficiências nutricionais (HILDESHEIM *et al.*, 2002). Existem ainda alguns fatores que contribuem para a progressão da infecção pelo HPV, que estão ligados ao processo de aquisição do HPV, que não são considerados co-fatores, como por exemplo a idade da sexarca, número de parceiros sexuais e história de doença sexualmente transmissível (DST) (BASEMAN *et al.*, 2005).

1.1.5.1 Uso de anticoncepcional oral

Diferente de outras neoplasias malignas ginecológicas de alta prevalência, o câncer cervical tradicionalmente não tem sido considerado como hormônio-dependente (PINTO *et al.*, 2002). Entretanto, hormônios esteróides na forma de contraceptivos comumente administrados durante a fase reprodutiva parecem aumentar a atividade transformadora dos oncogenes do HPV e interferir na resolução eficiente de lesões causadas pelo vírus na cérvix de mulheres jovens (PINTO *et al.*, 2002).

A contracepção hormonal por menos de cinco anos parece não aumentar o risco (SMITH *et al.*, 2003). Alguns estudos epidemiológicos apontam que o uso de contraceptivos orais por longo período (maior que 5-6 anos) está associado ao desenvolvimento do câncer cervical, em mulheres infectadas pelo HPV, sendo 2,8 vezes maior a chance de desenvolver câncer naquelas que fazem contracepção hormonal por 5 a 9 anos (SMITH *et al.*, 2003; VILLIERS *et al.*, 2003). Esse risco aumenta quando a exposição ao ACO é relatada pelo período de mais de dez anos, passando a ser quatro vezes maior (SMITH *et al.*, 2003). No entanto, o uso de progesterona (acetato de medroxiprogesterona depo) trimestral parece não aumentar o risco de câncer

de colo, e não existem muitos estudos relatando a ação dos anticoncepcionais injetável mesais (WHO, 1993; SMITH *et al.*, 2003).

O mecanismo responsável pela ação dos hormônios na carcinogênese do câncer cervical ainda não está bem elucidado, acredita-se que os hormônios promoveriam a integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro com desregulação da expressão das proteínas E6 e E7 (MITRANI-ROSENBAUM *et al.*, 1989; ARBEIT *et al.*, 1996). Estudos experimentais *in vivo* demonstram que existe sinergismo entre longo tempo de exposição ao estrogênio e carcinogênese cervical pelo HPV16 (MITRANI-ROSENBAUM *et al.*, 1989; ARBEIT *et al.*, 1996; ROSA *et al.*, 2009).

1.1.5.2 Paridade

Durante muito tempo acreditou-se que a multiparidade pudesse aumentar o risco de câncer cervical, no entanto, tal associação confundia-se com o comportamento sexual (ROSA *et al.*, 2009).

No estudo de Stival *et al.*, relatam que o fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical dobra nas mulheres que tiveram quatro filhos ou mais, quando comparado com o risco das que tiveram um ou nenhum. O estudo realizado por Medeiros *et al.*, relata que quando primeiro parto dá-se antes dos 20 anos, há uma maior probabilidade do desenvolvimento de câncer. Já no estudo de Castle *et al.* não foi encontrada associação, o que poderia ser explicado pela baixa paridade da população estudada, e no estudo de Deacon *et al.*, encontrou-se associação limítrofe.

O que poderia explicar a associação entre paridade e neoplasia cervical é o estados nutricional, os traumatismos e mecanismos imunológicos, além da das trocas hormonais induzidas pela gestação poderiam estar relacionadas à persistência ou à progressão do HPV (ROSA *et al.*, 2009).

1.1.5.3 Tabagismo

Exposição, idade de início, período e frequência de consumo de cigarros, são fatores que parecem influenciar na incidência de NIC e câncer cervical (HAEVERKOS *et al.*, 2000; KJELLBERG *et al.*, 2000, PINTO *et al.*,

2002). Os dois mecanismos principais pelo qual o hábito de fumar contribui para a oncogênese cervical incluem a exposição direta do DNA de células epiteliais cervicais a nicotina e a cotidina, e a produtos metabólicos de reações com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aminas aromáticas, outros componentes da fumaça do cigarro (HELLBERG *et al.*, 1988; SIMONS *et al.*, 1993, PINTO *et al.*, 2002).

Um segundo mecanismo que pode explicar a carcinogênese relacionada ao tabaco é a imunossupressão (PINTO *et al.*, 2002). Alterações verificadas no sistema imune periférico de pacientes fumantes incluem a elevação do número de células sangüíneas, o aumento do número de linfócitos T citotóxicos/supressores, a diminuição do número de linfócitos T indutores/auxiliares, discreta supressão da atividade de linfócitos T, significativo decréscimo da atividade de linfócitos natural killer, e baixos níveis sangüíneos de imunoglobulinas, exceto pela IgE, a qual é elevada. Uma diminuição do número de células de Langerhans na cervix de mulheres fumantes tem sido observada por muitos autores (JOHNSON *et al.*, 1990; POPPE *et al.*, 1996; PINTO *et al.*, 2002).

No estudo de ROTELI-MARTINS *et al.* (1998), o fumo e a detecção do DNA do HPV estavam significativamente associados a NIC 2 e 3, com uma incidência de 6,6 vezes maior em mulheres fumantes quando comparadas com não fumantes.

1.1.5.4 Imunossupressão

A infecção pelo HPV incidente e persistente ocorre mais freqüentemente em mulheres HIV positivas, comparadas com as HIV negativas. Sabe-se que o vírus suprime gradualmente a imunidade do indivíduo ao eliminar as células com o receptor T CD4+, responsáveis pela resposta imunológica humoral e celular (CAMPOS *et al.*, 2005 ; SOUZA *et al.*, 2001; DE SANJOSE *et al.*, 2002).

Estudos têm associado a persistência do HPV à contagem de linfócitos T CD4+. No estudo de Ahdieh *et al.*, a persistência do HPV foi 1,9 vezes maior nas mulheres com a contagem de células CD4+ abaixo de 200 células/mm³, comparadas com as que apresentavam contagem de células CD4+ maior que

500 células/mm³ (AHDIEH *et al.*, 2000; AHDIEH *et al.*, 2001). Em outro estudo, envolvendo mulheres HIV positivas e HIV negativas, a incidência do *clearance* do HPV foi 0,29 e 0,10, respectivamente naquelas com contagem de células CD4+ acima de 200 células/mm³ e nas que apresentaram contagem de células CD4+ menor que 200 células/mm³ (AHDIEH *et al.*, 2000; AHDIEH *et al.*, 2001).

A maior prevalência do HPV no colo uterino em pacientes soropositivas para o HIV e a imunossupressão decorrente desta infecção aumentam o risco de desenvolvimento de NIC, recomendando-se estrito controle citológico, colposcópico e o uso de terapias ablativas, quando diagnosticadas as lesões intra-epiteliais (CAMPOS *et al.*, 2005 ; SOUZA *et al.*, 2001; DE SANJOSE *et al.*, 2002; NAPPI *et al.* , 2005; CHEN *et al.*, 2005). Além disso, o controle imunológico dessas pacientes é citado como um aliado na prevenção destas neoplasias, já que se acredita que exista associação entre a contagem de linfócitos T CD4+, a carga viral do HIV e a persistência do HPV (STRICKLER *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2003).

1.1.5.5 Deficiências nutricionais

Pesquisas indicam que alguns nutrientes antioxidantes, como as vitaminas A, E e C, podem inibir a formação de radicais livres e a evolução de lesões malignas no epitélio do colo uterino, atuando como moduladores da resposta imune frente à presença e/ou à persistência da infecção por HPV (MARSHALL *et al.*, 2003; GIULIANO *et al.*, 2000; PALAN *et al.*, 2003). No entanto, a relação entre os fatores nutricionais e o desenvolvimento de neoplasia do colo do útero é complexa, em razão dos múltiplos fatores etiológicos e inúmeros fatores de riscos envolvidos na gênese e no desenvolvimento desse tumor (DOLL *et al.*, 1999).

Estudos de revisão com carotenóides (betacaroteno encontrado na cenoura, folhas verde escuras, vegetais de cor amarela e laranja; e o licopeno encontrado no tomate, melancia, mamão e goiaba), vitamina C (encontrada nas frutas cítricas principalmente) e a vitamina E (tocoferóis encontrados nos óleos vegetais) demonstraram que esses podem ser agentes de proteção principalmente nos estágios iniciais da carcinogênese cervical, protegendo

contra a persistência e a progressão subsequente de infecções por HPV (GIULIANO *et al.*, 2000; BLOCK *et al.*, 2000). No entanto, alguns estudos encontraram associação inversa entre β -caroteno e risco de lesões intraepiteliais e câncer invasivo (PALAN *et al.*, 1996; POTISCHMAN *et al.*, 1991; BATIEHA *et al.*, 1993).

A alimentação equilibrada tem papel importante na prevenção do câncer do colo do útero, porém são necessários maiores estudos, preferencialmente prospectivos e com períodos de seguimento maiores do que um ano, afim de avaliar a influência de nutrientes antioxidantes na persistência do HPV, para propor recomendações nutricionais específicas na prevenção desta patologia. (CERUTTI, *et al.*, 1991).

1.2 Biomarcadores

Um biomarcador é um marcador molecular biológico que serve como indicador de processos biológicos normais ou patogênicos, além disso, ajuda a avaliar a respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (LARI *et al.*, 2011; BUHMEIDA *et al.*, 2011). Nas neoplasias os biomarcadores podem ser usados para ajudar no diagnóstico da doença, detecção do estadiamento, monitoramento da resposta à terapia e previsão de prognóstico do paciente (LARI *et al.*, 2011; KELLY *et al.*, 2006). Um biomarcador pode ser de DNA, ácido Ribonucléico (RNA), ou um marcador de proteína medido diretamente nos tecidos, soro ou outros fluidos corporais (LARI *et al.*, 2011).

Em lesões cervicais pré- cancerosas, a principal preocupação é de prever o progresso da lesão (GUPTA *et al.*, 2010). Os avanços recentes nas tecnologias genômicas e proteômicas juntamente com os avanços nas ferramentas de bioinformática mostram uma variedade de novos biomarcadores de câncer que são sensíveis e específicos, com impacto no diagnóstico e uma melhor gestão do paciente (GUPTA *et al.*, 2010).

Recentes estudos de expressão gênica de perfis identificaram um conjunto de candidatos a marcadores moleculares que estão associadas à HSIL (KELLY *et al.*, 2006). Um biomarcador que está sendo estudado é o TriPath Imaging, Burlington, NC (ProEx C), que tem um valor preditivo positivo mais elevado em comparação com p16 , e consiste em um coquetel

imunocitoquímico de um anticorpo contra a topoisomerase II- α (TOP2A) e dois anticorpos contra a proteína manutenção minichromosome 2 (MCM2) (SIDDQUI *et. al.*, 2008 ; GUPTA *et. al.*, 2010; BECCATI *et. al.*, 2008).

Essas moléculas estão associadas com a matriz extracelular e estão envolvidas na replicação e proliferação celular (KELLY *et. al.*, 2006). A indução da proliferação celular (fase S) em células com HSIL é iniciada, em parte, pela atividade das proteínas E6 e E7 do HPV (KELLY *et. al.*, 2006). Foi estabelecido que o HPV E7 se liga a retinoblastoma (Rb) e desloca o ativador transcricional, E2F, de seu complexo, induzindo a transcrição de proteínas aberrantes, como MCM2 e TOP2A que são responsáveis pela síntese de DNA e proliferação celular (KELLY *et. al.*, 2006). TOP2A é uma enzima nuclear de DNA, e o aumento de sua expressão está relacionado com HPV de alto risco e é associada significativamente com a progressão de NIC I para NICIII (BECCATI *et. al.*, 2008).

MCM2 é um membro da família MCM de proteínas, que são necessários em um estágio inicial da replicação do DNA para montar origens de replicação e para a progressão de replicação como uma helicase replicativa (BECCATI *et. al.*, 2008). A evidência atual sugere que MCM2, MCM6, MCM7 e TOP2a, m-RNAs são aumentados no carcinoma cervical de células escamosas e adenocarcinoma do colo do útero, e que as respectivas proteínas codificadas também apresentam um aumento na sua expressão em displasia cervical e carcinoma (BECCATI *et. al.*, 2008).

Os biomarcadores permitem o monitoramento de eventos moleculares essenciais em amostras histológicas ou citológicas e são susceptíveis de melhorar a detecção de lesões que têm um alto risco de progressão em ambas as configurações de rastreamento primário e de triagem (GUPTA *et. al.*, 2010). NIC é um processo dinâmico e o epitélio pode apresentar resultados diferentes ao longo do tempo e as lesões podem progredir, manter ou regredir (GUPTA *et. al.*, 2010). Um patologista, ao realizar a interpretação de uma biópsia do colo do útero observa ao microscópico características da representação da morfologia estática e fornece pouca informação dos processos dinâmicos subjacentes da doença (GUPTA *et. al.*, 2010). Isto enfatiza a necessidade de métodos adjuvantes para interpretar a impressão real da morfologia de uma lesão NIC em termos dinâmicos (GUPTA *et. al.*, 2010). Tais métodos adjuvante

também são importantes para uma melhor distinção de NIC de lesões não neoplásicas (GUPTA *et. al.*, 2010).

A citologia pode proporcionar uma excelente sensibilidade para a detecção de HSIL e alguns LSIL, porém com altas taxas de resultados falso-negativos, assim como a captura híbrida para a identificação dos tipos de HPVs que apresenta alta sensibilidade, mas taxa de falso-positivo que pode chegar a 27% (SHI *et. al.*, 2007).

No entanto, Proex-C pode ser usado como uma alternativa aos testes de HPV, porque a sensibilidade para a detecção de neoplasia intra-epitelial cervical NIC II usando ProEx C pode chegar a 99% em alguns estudos (OBERG *et. al.*, 2010).

1.3 Métodos de Diagnóstico

1.3.1 Exame Citopatológico

O exame citopatológico consiste na avaliação de alterações celulares encontradas na zona de transformação da cérvix. No procedimento, células são raspadas do colo do útero, com o auxílio de uma espátula, espátula de Ayre, e uma escova citológica. Em seguida o material é distendido sobre uma lâmina, fixado em etanol 95% , corado pelo método de Papanicolaou e examinado sob um microscópio. A terminologia usada é a proposta pelo *National Cancer Institute*, que é a terminologia de Bethesda 2001 (PIAS *et. al.*, 2009; STIVAL *et. al.*, 2005).

Um fator limitante da citologia convencional são as amostras insatisfatórias (cerca de 10%), resultados falso-negativos, além disso, existe uma grande variabilidade de interpretação dos resultados entre diferentes citologistas (SHI *et. al.*, 2007; SIDDIQUI *et. al.*, 2008). A literatura aponta como sendo as principais causas de resultados falsos negativos, a colheita do material, erro no escrutínio do esfregaco ou na interpretação dos achados citológicos (PIAS *et. al.*, 2009).

A citologia em base líquida é um método introduzido a fim de reduzir os números de resultados falso-negativos. Nesse método, as amostras são

coletadas utilizando um meio líquido de transporte para preservar a arquitetura das células, ao invés de confeccionar imediatamente os esfregaços na hora da coleta (SHI *et. al.*, 2007; SIDDIQUI *et. al.*, 2008).

O exame de Papanicolaou é a ferramenta mais eficaz de triagem para o câncer, e depois da introdução do exame a incidência de câncer do colo do útero diminuiu drasticamente em todo o mundo (SHI *et. al.*, 2007; SHROYER *et. al.*, 2006). No entanto, a prática da citopatologia cervical tem especificidade limitada, como em anormalidade citológica de baixo grau (SHROYER *et. al.*, 2006). Exames de Papanicolaou recorrentes contribuem significativamente para um bom sucedido programa de rastreio, no entanto, mesmo com o cumprimento perfeito, o sistema tem suas limitações por causa da variação interpretativa, morfológicas e subjetividade, sendo colposcopia / biópsia cervical ainda uma abordagem de diagnóstico necessários para estabelecer um diagnóstico de LSIL ou HSIL (SHI *et. al.*, 2007; SIDDIQUI *et. al.*, 2008).

1.3.2 Exame Colposcópico

Os achados colposcópicos contribuem para o diagnóstico da infecção por HPV e das lesões epiteliais associadas. A colposcopia é um exame de imagem realizado com um aparelho, conhecido como colposcópico, o qual permite a visualização do colo uterino com um aumento de dez a quarenta vezes (PIAS *et. al.*, 2009; STIVAL *et. al.*, 2005). No primeiro momento, o colo uterino é focalizado sem aplicação de qualquer solução, para que assim seja possível avaliar anormalidades como as colorações anormais, lacerações e tumorações (PIAS *et. al.*, 2009). A seguir, é aplicada soluções de ácido acético a 3% e solução de Schiller, a fim de tornar as áreas de lesões mais evidentes e permitir a seleção onde será realizada a biópsia (PIAS *et. al.*, 2009).

Mediante a colposcopia, pode-se reconhecer, delimitar e diagnosticar os diferentes aspectos normais e anormais da ectocérvice e vagina. A classificação utilizada é a terminologia colposcópica da Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcópica (IFCPC, 1990) a qual divide os achados colposcópicos em normal, anormal, suspeito para câncer invasor e achado insatisfatório (PIAS *et. al.*, 2009; STIVAL *et. al.*, 2005).

1.3.3 Exame Histopatológico

O câncer do colo uterino é precedido por uma série de modificações do epitélio original, que constituem as lesões pré-cancerosas. Histologicamente ocorre uma desorganização da arquitetura do epitélio escamoso (diminuição ou ausência de maturação celular e de estratificação do epitélio), atipias nucleares (aumento de tamanho nuclear com aumento da relação núcleo/citoplasmática, hipercromasia e anisocariose), e figuras de mitose anormais (KURMAN & SOLOMON *et. al.*, 1997).

O diagnóstico histopatológico é realizado com amostras retiradas da lesão e, está baseado em critérios morfológicos da arquitetura tecidual, sendo considerada uma técnica padrão ouro do diagnóstico morfológico (PIAS *et. al.*, 2009). Esse exame é realizado em amostras retiradas de uma área suspeita de presença de lesão (PIAS *et. al.*, 2009). Para esse exame, é utilizada a classificação de Richart, que se dividem em neoplasia intra-epiteliais cervicais I, II e III conforme o grau da lesão, carcinoma e adenocarcinoma “in situ” (PIAS *et. al.*, 2009).

A histopatologia é o método de escolha para a gestão de mulheres com HPV para confirmar o diagnóstico de uma SIL, que é geralmente detectada pela primeira vez pelo rastreio citológico (WALTS *et. al.*, 2009; PINTO *et. al.*, 2008). A relação entre a infecção persistente com HPV de alto risco e o câncer cervical resultou no desenvolvimento de sistemas para a detecção de HPV, tais como a hibridização in situ (ISH) e reação em cadeia da polimerase (PCR), que podem indicar a presença de HPV, mas não fornece avaliação do grau de displasia e não pode prever progressão de lesões intra-epiteliais e, possivelmente, o câncer cervical (WALTS *et. al.*, 2009; ZEGELS *et. al.*, 2010; BOULET *et. al.*, 2009). Dada a alta prevalência de infecções transitórias, a detecção viral tem um valor preditivo positivo pobre, tornando-se uma forma incompleta de identificar mulheres em risco (BOULET *et. al.*, 2009). Além disso, estes testes são trabalho intensivo e realizado apenas em laboratórios especializados (WALTS *et. al.*, 2009).

1.3.4 Exame Imuno-Histoquímico

A imuno-histoquímica surgiu com as pesquisas em imunopatologia que começaram na década de 1940, mas somente a partir de 1974, quando foi possível demonstrar alguns antígenos tissulares pela técnica de imunoperoxidase em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, é que a imuno-histoquímica foi aceita como um método simples e prático na rotina diagnóstica de patologia cirúrgica (BODEY *et. al.*, 2002; LEONG *et. al.*, 1987; ROSA *et. al.*, 1996; SWANSON *et. al.*, 1997; WERNER *et. al.*, 2005).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais, que propiciaram uma enorme fonte de reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos tissulares ou celulares, e o advento da recuperação antigênica foram fatos marcantes na evolução da imuno-histoquímica (BODEY *et. al.*, 2002; WERNER *et. al.*, 2005; SALLES *et. al.*, 2009). Houve tal avanço na contribuição e na aplicação da imuno-histoquímica na patologia cirúrgica que o fenômeno passou a ser conhecido como a revolução marrom do laboratório de histopatologia (LEONG *et. al.*, 1987; WERNER *et. al.*, 2005).

OBJETIVOS

Objetivos primários

Determinar a acurácia (sensibilidade e especificidade) de biomarcador ProEx C em mulheres com diagnóstico de ASC-US, LSIL, HSIL em exame de Papanicolau ou citologia em base líquida com colposcopia anormal, que tinha concomitantes biópsia cervical.

Objetivos secundários

Realizar uma revisão sistemática de estudos com enfoque diagnóstico para avaliar a atividade do biomarcados ProEx C em lesões cervicais.

REFERENCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

AHDIEH L, MUNOZ A, VLAHOV D, TRIMBLE CL, TIMPSON LA, SHAH K. Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *Am J Epidemiol*. Vol.151(12), pag. 1148-57, 2000.

AHDIEH L, KLEIN RS, BURK R, CU-UVIN S, SCHUMAN P, DUERR A, et al. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J Infect Dis*. Vol. 184(6), pag. 682-90, 2001.

ARBEIT JM, HOELEY PM, HANAHAN D. Chronic estrogen- induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 93, pag. 2930-5, 1996.

BASEMAN JG, KOUTSKY LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*, Vol. 32, pag. 16-24, 2005.

BATIEHA AM, ARMENIAN HK, NORKUS EP, MORRIS JS, SPATE VE, COMSTOCK GW. Serum micronutrients and the subsequent risk of cervical cancer in a population-based nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* , Vol. 2, pag. 335-9, 1993.

BECCATI M. D. ,BURIANI C., PEDRIALI M., ROSSI S., NECI I. Quantitative Detection of Molecular Markers ProEx C (Minichromosome Maintenance Protein 2 and Topoisomerase IIa) and MIB-1 Liquid-based Cervical Squamous Cell Cytology. *American Cancer Society*, Vol. 114, pag. 196-203, 2008.

BEHAR M.M; SALCEDO P.; SILVEIRA V.; *et al.* A expressão da proteína p 16 e herpes simples vírus tipo 2 em lesões pré-neoplásicas do colo do útero. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. Vol. 30(2), pag. 61-66, 2008.

BODEY, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Expert Opin Biol Ther*, Vol. 2(4), pag. 371-93, 2002.

BLOCK MD, JEROME B, SETEVEN MS. Clinical evidence supporting cancer risk reduction with antioxidants and implications for diet supplementation. *The journal of the American Nutraceutical Association : JANA*, Vol. 3, pag. 6-16, 2000.

BOSCH FX, LORINCZ A, MUNOZ N, MEIJER CJ, SHAH KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, Vol. 55, pag. 244-65, 2002.

BOULET A.V.G., BENOY I.H., DEPUYDT C.E. Human Papillomavirus 16 Load and E2/E6 Ratio in HPV 16-Positive Women: Biomarkers for Cervical Intraepithelial Neoplasia ≥ 2 in a Liquid-Based Cytology Setting. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, Vol. 18(11), pag. 2992-9, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas para 2008. Disponível em (http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326), acessado em 08/11/2009.

BUHMEIDA A., ALI P.Z.A. Biomarkers in cancer: is "omices" the way to go. *Libyan J Med*, Vol. 6(5982), pag. 1-2, 2011.

BURD E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*, Vol. 16(1), pag. 1-17, 2003.

CAMPOS RR, MELO VH, DEL CASTILHO DM, NOGUEIRA CPF. Prevalência do papilomavírus humano e seus genótipos em mulheres portadoras e não-portadoras do vírus da imunodeficiência humana. *Rev Bras Ginecol Obstet*. Vol. 27(5), pag. 248-56, 2005.

CASTELE PE, WACHOLDER S, LORINCZ AT, SCOTT DR, SHERMAN ME, GLASS AG, et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk

among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 94, pag. 1406-14, 2002.

CERUTTI PA. Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur J Clin Invest*, Vol. 21, pag. 1-5, 1991.

CHAN, S.Y., DELIUS H., HALPERN A.L., BERNARD H.U. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: Uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *Journal of Virology*, Vol. 69 (5), pag. 3074-3083, 1995.

CHEN MJ, WU MY, YANG JH, CHAO KH, YANG YS, HO HN. Increased frequency of genital human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive Taiwanese women. *J Formos Med Assoc.* Vol. 104(1), pag. 34-8, 2005.

COX JT. The development of cervical cancer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection? *Curr Opin Obstet Gynecol.* Vol. 18 (1) , pag. s5-s13, 2006.

CURRIN L. G.; JACK R. H.; LINKLATER K. M.; *et al.* Inequalities in the incidence of cervical cancer in South East England 2001–2005: an investigation of population risk factors. *BioMed Central Public Health*, Vol. 62(9), pag. 1-10, 2009.

DEACON JM, EVANS CD, YULE R, DESAIM, BINNSW, TAYLORr C, *et al.* Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer*, Vol. 83, pag. 1565-72, 2000.

DE SANJOSE S, PALEFSKY J. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Res.* Vol. 89(2), pag. 201-11, 2002.

DOLL R. The Pierre Denoix Memorial Lecture: nature and nurture in the control of cancer. *Eur J Cancer*, Vol. 35, pag. 16-23, 1999.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, Vol. 32, pag. 7-15, 2005.

FENG Q.; CERNE S.; WINER R.L.; *et al.* Development and Evaluation of a Liquid Beas Microarray Assay for Genotyping Genital Human Papillomaviruses. *Journal of clinical Microbiology*. Vol 47(5), pag. 547-533, 2009.

FERRIS DG. Vaccines for preventing HPV-related anogenital infection and neoplasia. *J Am Osteopath Assoc.*, Vol.106(3), pag. S9-13, 2006.

FRANCO E.L., DUARTE-FRANCO E., FERENCZY A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*, Vol. 164, pag. 1017-1025, 2001.

FRANCO EL, HARPER DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical control. *Vaccine*, Vol. 23, pag. 2388-94, 2005.

FREITAS T.P. CARMO B.B.; PAULA F.D.F.; *et al.* Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medecicina Tropical*, Vol. 49(5), pag. 297-301, 2007.

GARCIA-PIÑES A.J.; HILDESHEIM A; DODDS L; *et al.* Gene Expression Patterns Induced by HPV-16 L1 VLP in Leukocytes from Vaccine Recipients. *J Immunol.*, Vol. 182(3), pag. 1706-1729, 2009.

GROSS, G. E; BARRASSO, R. Infecção por papilomavirus humano: Atlas clínico de HPV. *ARTMED*, Vol. 01, pag. 432, 1999.

GIULIANO A. The role of nutrients in the prevention of cervical dysplasia and cancer. *Nutrition*, Vol. 16, pag. 570-73, 2000.

GUPTA N., SRINIVASAN R., RAIWANSHI A. Functional biomarkers in cervical precancer: an overview. *Diagn Cytopathol*, Vol. 38(8), pag. 618-23, 2010.

HAEVERKOS H, ROHRER M, PICKWORTH W. The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomed Pharmacother.*, Vol. 54(1), pag. 54-9, 2000.

HAWS, A.L.F. *et al.* Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *Journal of Virological Methods*, Vol. 122, pag. 87- 93, 2004.

HELLBERG D, NILSSON S. Haley, N.J.; Hdefman, D.; Wynder, E. *et al.* Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine e cotidine in serum e cervical mucus in smokers e nonsmokers. *Am J Obstet Gynecol.*, Vol. 158 (4), pag. 910-3, 1988.

HILDESHEIM A, WANG SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res*, Vol. 89, pag. 229-40, 2002.

JEON S, LAMBERT PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* , Vol. 92, pag. 1654-8, 1995.

JOHNSON JD, HOUCHENS D, KLUWE WM, CRAIG DK, FISHER GL. Effects of the mainstream and environmental tobacco smoke on the immune system in animals e humans: a review. *Critical Reviews in Toxicology.*, Vol. 20 (5), pag. 369-390, 1990.

LARI S.A., KUERER H. M. Biological markers in DCIS and Risk of Breast recurrence: A Systematic Review. *Journal of Cancer*, Vol. 2 , pag. 232-261, 2011.

LEONG A, WRIGHT J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. *Histopathology*, Vol. 11(12), pag. 1295-1305, 1987.

MARSHALL K. Cervical dysplasia: early intervention. *Altern Med Rev*, Vol. 8, pag. 156-66, 2003.

MCMURRAY H. R., NGUYEN D., WESTBROOK T.F., MCANCE D.J. Biology of Human papillomaviruses. *International Journal of Experimental Pathology*, Vol. 82 (1), pag. 15-33, 2001.

MEDEIROS V.C.R.D., MEDEIROS R.C., MORAES L.M., *et al.* Câncer de Colo de Útero: Análise Epidemiológica e Citopatológica no Estado do Rio Grande do Norte. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Vol. 37 (4), pag. 227-231, 2005.

MELO VH, ARAUJO ACL, RIO SMP, CASTRO LPF, AZEVEDO AA, CASTRO MM. Problemas ginecológicos mais freqüentes em mulheres soropositivas para o HIV. *Rev Bras Ginecol Obstet*. Vol. 25(9) , pag. 661-6, 2003.

MITRANI-ROSENBAUM S, TSVIELE R, TUR-KASPA R. Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells. *J Gen Virol*, Vol. 70 (8), pag. 2227-32, 1989.

MOODY C.A.; LAIMINS L.A. Human Papillomaviruses Activate the ATM DNA Damage Pathway for Viral Genome Amplification upon Differentiation. *Plos Pathogens*, Vol. 5(10), 1000605, 2009.

MUÑOZ N, BOSCH FX, de SANJOSE S, HERRERO R, *et al.* International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, Vol. 348 (6), pag. 518-27, 2003.

MUÑOZ N., CASTELLSAGUÉ X., GONZÁLEZ A.B., GISSMANN L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, Vol. 21(24S3), pag. S1-S10, 2006.

NADAL, S.R., MANZIONE C. R. Vacinas Contra o Papiloma Virus Humano. *Revista Brasileira Coloproctologia*, Vol. 26 (3), pag. 337-340, 2006.

NAPPI L, CARRIERO C, BETTOCCHI S, HERRERO J, VIMERCATI A, PUTIGNANO G. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and untreated women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. Vol. 121(2), pag. 226-32, 2005.

OBBERG T.N., VRANA B.R.K.J., BARTHOLET M.K., *et al.* Comparison of p16^{INK4a} and ProExTM C Immunostaining on Cervical ThinPrep Cytology and Biopsy Specimens. *Diagnostic Cytopathology*, Vol. 38 (8), pag. 564-572, 2010.

OLIVEIRA, L. H. S.; ROSA, M. L. G.; CAVALCANTI, S. M. B. Patterns of genotypes distribution in multiple human papillomavirus infections. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 14, pag. 60-65, 2008.

PALAN PR, MIKHAIL MS, GOLBERG GL, BASU J, RUNOWICZ CD, ROMMEY SL. Plasma levels of betacarotene, lycopene, canthaxanthin, retinol, and alpha- and tau-tocopherol in cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Clin Cancer Res*, Vol. 2, pag. 181-5, 1996.

PALAN P. Getting your cells in line. Prevention's healing with vitamins: cervical dysplasia. *Cancer Treat Res*, Vol. 10, pag. 153-8, 2003.

PEREIRA K.M.A.; SANTOS P.P.A; ROCHA D.A.P.; *et al.* Papilomavírus humano e câncer oral: uma revisão dos conceitos atuais. *Revista de Odontologia da UNESP*, Vol. 36, N° 02, pag. 151-156, 2007.

PIAS A.A., VARGAS V.R.A. Avaliação dos exames citológicos de papanicolaou com células epiteliais atípicas e respectivos exames colposcópicos com relação aos exames histopatológicos. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Vol. 41(2), pag. 155-160, 2009.

PINTO A.P., TULIO S., CRUZ O.R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical *Rev Assoc Med Bras*, Vol. 48(1), pag. 73-78, 2002.

POPPE WA, DRIJKONINGEN M, IDE PS, LAWERYNS JM, VAN ASSCHE FA. Langerhans-cells and L1 antigen expression in normal e abnormal squamous epithelium of the cervical transformation zone. *Gynecol Obstet Invest*, Vol 41(3), pag. 207-13, 1996.

POTISCHMAN N, HERRERO R, BRINTON LA, REEVES WC, STACEWICZ-SAPUNTZAKIS M, JONES CJ et al. A casecontrol study of nutrient status and invasive cervical cancer. II. Serologic indicators. *Am J Epidemiol*, Vol. 134, pag. 1347-55, 1991.

PYEON D., PEARCE S.M.; LANK S.M. *et al.* Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression. *PLoS Pathogens*, Vol. 05(2), 100318, 2009.

RAMA C.H.; MARTINS-ROTELI C. M.; MAURICETTE S. F.; *et al.* Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. *Revista de Saúde Pública*, Vol. 42, N° 03, pag. 411-419, 2008.

RIVOIRE W A, CORLETA HVE, BRUM IS, *et al.* Biologia molecular do câncer cervical. *Rev. Bras. Saúde Materno Infantil*, Vol. 6 (4), pag. 447-451, 2006.

ROSA J. Special techniques in surgical pathology. In: *Ackerman's Surgical Pathology*. 8 ed. Nova York: Mosby-Year Book, pag. 29-62, 1996.

ROSA M.I.; MEDEIROS L.R.; ROSA D.D.; *et al.* Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Caderno de Saúde Pública*, Vol. 25, N° 05, pg. 953-964, 2009.

ROTELI-MARTINS C.M., PANETTA K., ALVES, V.A.F., SIQUEIRA S.A.C., SYRJANEN K.J., DERCHAIN S.F.M. Cigarette smoking and high-risk HPV DNA as predisposing factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young Brazilian women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, Vol. 77, pag. 678-682, 1998.

SALLES M. A., CURCIO V.S., PEREZ A.A., GOMES D.S., GOBBI H. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. *J Bras Patol Med Lab*, Vol. 45 (3), pg. 213-222, 2009.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *International Journal of Gynecological Cancer*, Vol.15, pag. 727-746, 2005.

SHI J. *et al.* Evaluation of p16^{INK4a}, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase II α , ProEx C, and p16^{INK4a}/ProEx C in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol*, Vol. 38, pg 1335-44, 2007.

SHROYER K. R., HOMER P., HELNZ D., SINGH M. Validation of Novel Immunocytochemical Assay for Topoisomerase II- α and Minichromosome Maintenance Protein 2 Expression in Cervical Cytology. *American Cancer Society*, Vol. 108, pag. 324-330, 2006.

SIDDIQUI MT *et al.* ProEx C immunocytochemistry and high-risk human papillomavirus DNA testing in Papanicolaou tests with atypical squamous cell (ASC-US) cytology. *Arch Pathol Lab Med*, Vol 132, pag. 1648-52, 2008.

SIMONS AM, PHILLIPS DH, COLEMAN DV. Damage to DNA in cervical epithelium related to smoking tobacco. *Br Med J.*, Vol. 306, pag. 1444-1448, 1993.

SMITH JS, GREEN J, BERRINGTON-DE-GONZALEZ A, APPLEBY P, PETO J, PLUMMER M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet*, Vol. 361, pag. 1159-67, 2003.

SOUZA NST, MELO VH, CASTRO LPF. Diagnóstico da infecção pelo HIV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: acuidade da histopatologia. *Rev Bras Ginecol Obstet*. Vol. 23(6), pag. 355-61, 2001.

SOUZA P.S.; MACIAG P.C.; RIBEIRO K.B. *et al.* Interaction between polymorphisms of the Human Leukocyte Antigen and HPV-16 Variants on the risk of invasive cervical cancer. *BioMed Cancer*, Vol. 246 (08), pag. 1-9, 2008.

STIVAL, C. O.; LAZZAROTTO, M.; RODRIQUES, Y. B. et al.. Avaliação Comparativa da Citologia Positiva, Colposcopia e Histopatologia: Destacando a Citopatologia como Método de Rastreamento do Câncer do Colo do Útero. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Vol. 37(4) , pag. 215-215, 2005.

STOLER, M. H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, Vol. 127, pag. 935-939, 2003.

STRICKLER HD, BURK RD, FAZZARI M, ANASTOS K, MINKOFF H, MASSAD LS, et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst*. Vol. 97(8), pag. 577-86, 2005.

SWANSON PE. Hierarchy: the state of the art in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*, Vol. 107(2), pag. 139- 40, 1997.

THOMISSON J., THOMAS L. K., SHROYER K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology*, Vol. 39 (2) , pag. 154-166, 2008.

VILLIERS EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int.J.Cancer* Vol. 103 (6) , pag. 705-8, 2003.

VILLIERS E.M., FAUGUET C., BROKER T.R., *et al.* Classification of papillomaviruses. *Virology*, Vol. 324, pag. 17– 27, 2004.

WALTS A.E., BOSE S. p16, Ki-67, and BD ProExTM Cimmunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Human Pathology*, Vol. 40, pag. 957-964, 2009.

WANG H.; DUFFY A.A.; BROKER T.R.; *et al.* Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. *Genes & Development*, Vol. 23, pag.181–194, 2009.

WEAVER BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc*. Vol. 106(3 Suppl 1), pag. S2-8, 2006.

WERNER, B., CAMPOS A. C., NADJI M., TORRES L.F.B. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. *J Bras Patol Med Lab*, Vol. 41 (5), pag. 353-364, 2005.

WILEY D, MASONGSONG E. Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv*.Vol.61(6 Suppl 1), pag. S3- 14, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Depot-medroxyprogesterone acetate (DPMA) and cancer: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ*, Vol. 71, pag. 669-76, 1993.

ZEGELS G., RAEMDONCK G.A.A.V., TJALMA W.A., OSTADE X.W.V. Use of cervicovaginal fluid for the identification of biomarkers for pathologies of the female genital tract. *BioMed Central*, Vol. 8 (63), pag. 1-23, 2010.

KADAJA M.; PAAS H.I.; LAOS T.; *et al.* Mechanism of Genomic Instability in Cells Infected with the High-Risk Human Papillomaviruses. *PLoS Pathogens*, Vol. 5(4), 100397, 2009.

KAUFMAN RH, ADAM E, VONKA V. Human papillomavirus infection and cervical carcinoma. *Clin Obstet Gynecol*, Vol. 43, pag 363-80, 2000.

KELLY D., KINCAID E., FANSLER Z. ROSENTHAL D.L., CLARK D.P. Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions from cytology samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx™ C). *Cancer*, Vol. 108 (6), pag. 494-500, 2006.

KJELLBERG L, HALLMANS G, AHREN AM, JOHANSSON R, BERGMAN F, Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Câncer.*, Vol 82 (7), pag. 1332-8, 2000.

KURMAN R.J., SOLOMON D. O.. Sistema bethesda para o relato diagnóstico citológico cérvicovaginal. Rio de Janeiro: Revinter; 1997.

ARTIGO CIENTÍFICO

**ProEx C as a test for improving the detection and management
of cervical smear abnormalities**

ProEx C as a test for improving the detection and management of cervical smear abnormalities

Authors:

Andressa de Azambuja Pias Weber¹

Maria Isabel Edelweiss²

Lídia Rosi Medeiros³

Guisella de Latorre⁴

Marcia Edelweiss⁵

Affiliations of all authors:

¹PostGraduate Program Medical Clinical, University Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

²Pathology, Faculty of Medicine at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³Post doctoral fellow, Post-graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴Post Graduate Program Medical Clinical, University Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

⁵Assistant Attending Pathologist, Department of Pathology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Breast Patology and Cytopatology, New York, USA

ABSTRACT

A quantitative systematic review of the literature was performed to ascertain the accuracy of the biomarker ProEx C in patients with ASC-US, ASC-H and SIL. Studies that compared diagnostic of ASC-US, ASC-H, LSIL or HSIL in Pap Test, triage testing ProEx C and histopathology like the reference test were included. Five studies, including 713 women, were analyzed. 83% (355/429) of positive biopsy were positive for ProEx C activity, while 14% (41/284) of the negative biopsy were positive for ProEx C activity. Pooled sensitivity was 83% (95% IC, 79 to 87) and specificity was 85% (95%, 80 to 89) using software Meta-Disc. For cervical lesion vs positive or negative biopsy, the area under the curve (AUC) was 0.90 with Q* point value of 0.84. In conclusion, our data agree with the hypothesis that ProEx C represents an early event in cervical carcinogenesis that could be associated with the initiation and progression of cervical lesions and is expressed in the studies tests may reveal greater diagnostic accuracy of these tests.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia, cytology and pathology, meta-analysis, systematic review, ProEx C, monoclonal antibody immunohistochemistry.

RESUMO

Uma revisão sistemática da literatura foi realizada para verificar a precisão do biomarcador ProEx C em pacientes com ASC-US, ASC-H e SIL. Estudos que compararam diagnóstico de ASC-US, ASC-H, LSIL ou HSIL no Teste de Papanicolaou, teste de triagem ProEx C tendo histopatologia como o teste de referência foram incluídos. Cinco estudos, incluindo 713 mulheres, foram analisados. 83% (355/429) das biópsias positivas foram positivas para ProEx C, enquanto 14% (41/284) das biópsias negativas foram positivas para ProEx C. O somatório dos estudos para o cálculo de sensibilidade foi de 83% (95% IC, 79-87) e a especificidade foi de 85% (95%, 80 a 89) usando software Meta-Disc. Para lesão cervical vs biópsia positiva ou negativa, a área sob a curva (AUC) foi de 0,90 com valor do ponto Q * de 0,84. Em conclusão, nossos dados concordam com a hipótese de que o ProEx C representa um evento precoce na carcinogênese cervical e que poderiam estar associados com a iniciação e progressão de lesões cervicais e, se expressados nos exames estudados podem revelar maior acurácia diagnóstica destes exames..

Palavras-chave: neoplasia intra-epitelial cervical, citologia e patologia, meta-análise, revisão sistemática, ProEx C, anticorpo monoclonal, imunohistoquímica.

INTRODUCTION

Cervical cancer is the second most common type of cancer in women worldwide ⁽¹⁾. Human Papillomavirus (HPV) is the leading cause of cervical cancer and studies indicate that HPV DNA can be detected in 99.7% of women with histologically confirmed cervical cancer ^(2, 3).

Although HPV infections are among the most common sexually transmitted diseases, only a small subset of HPV infections will cause this type of cancer ⁽²⁾. Most cases of HPV infection regress spontaneously. In a minority of cases, the infection persists and may progress to a pre malignant or malignant lesion of the cervical mucosa. The persistence of infection with certain subtypes (mainly 16 and 18) of HPV is associated with the development of cervical cancer ^(4, 5).

Recent gene expression profiling studies have identified a set of candidate molecular markers that are associated with high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) ⁽⁶⁾. One such biomarker under review is ProEx C (Tripath Imaging, Burlington, NC), a nuclear stain comprised of monoclonal antibodies for minichromosome maintenance (MCM) and topoisomerase II alpha (TOP2A), two proteins associated with S-phase induction of the cell cycle ^(1,7). Overexpression of both of these proteins can be observed in cells with human papillomavirus (HPV) infection due to the inactivation of the retinoblastoma protein by the E7 gene of HPV ⁽⁷⁾. Therefore, we undertook a quantitative systematic review of the literature to ascertain the accuracy of the biomarker ProEx C in patients with atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), atypical squamous cells cannot exclude HSIL (ASC-H) and squamous intraepithelial lesions (SIL).

METHODS

Identification of studies

A comprehensive search of the MEDLINE (PubMed and OVID interface), EMBASE, LILACS, IBECs, BIOSIS, Web of Science, SCOPUS, index from

1966 to November 2011. The medical subjects heading (MeSH) and text words for the terms “*cervical neoplasm*” and “*ProEx C*” were combined with the MeSH term *diagnosis* (“sensitivity and specificity”). The search was limited to human studies but had no language restrictions. In addition, the Cochrane Library was searched. References lists of all available primary studies were reviewed to identify additional relevant citations. The authors who published the studies were not contacted.

Selection criteria

This review focused on studies that fulfill the three mandatory conditions for study selection that include Pap Test, triage testing ProEx C and histopathology like the reference test. Results of the diagnostic test of interest were compared with the results of a reference standard in all studies.

The outcome measure was accuracy of the biomarker ProEx C in patients with ASC-US, ASC-H and SIL. The studies were reviewed independently by three investigators (A.A.P.W, G.L.T, and M.I.E). Final inclusion and exclusion criteria were defined with reference to a selection criteria checklist. Disagreements on study inclusion or exclusion were initially solved by consensus, and when this was not possible, they were solved by arbitration by a forth review (M.E). The agreement statistics among reviewers were computed.

Quality assessment

All articles meeting the eligibility criteria were assessed for their methodological quality. Relevant features included the methods of data collection and patient selection, description of the ProEx C, description of the histological reference standard, and presence of verification bias^(8, 9). The quality assessment results for the included studies are summarized in the “*Scoring of Study Quality*” column of Table 1⁽¹⁰⁾. Quality was assessed with the Diagnostic Accuracy studies tool recommend by the Cochrane Collaboration (QUADAS)⁽¹¹⁾.

Data abstraction

Three investigators (A.A.P.W, M.I.E, and G.L.T) independently abstracted data regarding the prevalence of cervical lesion. The assessment of English-language articles was performed by 2 reviewers (A.A.P.W, G.L.T) while assessment of those articles published in language other than English were performed independently by 2 other reviewers (A.A.P.W, M.I.E) following translation (when necessary). Any disagreement was resolved by consensus for English and non-English studies. Data were abstracted as 2 X 2 tables regarding the presence of ProEx C activity (positive vs negative) and the histologic diagnosis (positive vs negative).

Data synthesis and statistical analysis

To evaluate agreement between study eligibility and methodological quality assessment as well as agreement between ProEx C and paraffin section analyses the observed percentage agreement and the κ coefficient for inter-rater reliability were calculated^(12,13). For each study, 2 x 2 contingency tables were constructed, in which all biopsies were classified as positive or negative for cervical smear abnormalities. The true-positive (TPR; sensitivity) and the false-positive rates (FPR; 1-specificity) and likelihood (LH) were calculated. When 2 X 2 tables had 0 cells with the value 0, it was excluded from the analysis⁽¹⁴⁾. Bivariate analysis was used to calculate pooled estimates of sensitivity, specificity, and likelihood ratios (LRs) along with 95% confidence intervals (CIs) for the summary estimates^(15, 16). The bivalent model preserves the 2-dimensional nature of diagnostic data by analyzing the logit transformed sensitivity and specificity of each study in a single model, and takes into account both within-study and between-study variability, in contrast to the Littenberg and Moses method that departs from fixed effects model⁽¹⁶⁻²⁰⁾.

The association between sensitivity and specificity for positive or negative for cervical smear abnormalities was calculated with the *Spearman's correlation coefficient test*^(13, 21, 22). When there was no correlation, pooling sensitivities and specificities were calculated, since there were two categories of results (negative or positive test)⁽²¹⁾. LH can be estimated from the summary estimates of sensitivity and specificity by using $LH_{positive} = sensitivity / 1 -$

specificity, and LH negative = $1 - \text{sensitivity/specificity}$ ^(17, 20, 21, 23, 24). LH indicate how much a given ProEx C activity finding increases or decreases the probability of final diagnosis of cervical cancer ^(18, 21, 25). The prevalence was calculated according to the following equation: $\text{TP} + \text{FN}/\text{number total cervical lesions extracted from contingency tables}$ ^(18, 21, 24). In addition, the pooled post-test probability estimates ($\text{post-test odds}/1 + \text{post-test odds}$) were calculated by multiplying the pre-test odds ($\text{prevalence}/1 - \text{prevalence}$) by the pooled LH resulting in post-test Odds. In the case of correlation, a summary receiver operating characteristic curve (SROC) was generated using data from all thresholds, using the Littenberg and Moses method ^(18, 21, 22, 26).

Also, the area under the curve (AUC) can summarize the inherent capacity of a test for discriminating a diseased from a non-diseased subject. Perfect tests usually have AUCs close to 1 and poor tests usually have AUCs close to 0.5 ^(18, 21, 22). The SROC is an excellent graphical summary, but for comparison purposes we calculated a further statistic – Q^* ⁽¹⁶⁾. Q^* is the point on the SROC where sensitivity and specificity are equal, like the area under the ROC curve, the Q^* point indicates how closely a test approaches the desirable performance of 100% sensibility and specificity. The higher the Q^* value, the better the diagnostic test performance. Sensitivity analysis were performed to assess excluding studies with a high risk of verification bias according to QUADAs. The statistical analysis was performed with the software Meta-DiSc[®] (version Beta 1.1.1) ⁽²⁷⁾.

RESULTS

The process of study is summarized in Figure 1. Our initial search identified 92 potentially relevant articles. We excluded 53 published after reviewing their titles and abstracts, because the three independent reviewers considered that they did not relate to the question under review. Thirty-nine full-text articles were retrieved studies; 34 were excluded after further scrutiny. A complete list of excluded studies is available from the authors. Five studies, including 713 women, met the criteria for inclusion and were analyzed.

Studies description

Details of the participants are summarized in Table 1. The mean age of participants was reported from one study ⁽²⁸⁾. All studies were non-blinded, cross-sectional and retrospective, with a small population, but included sufficient experimental details, proper diagnostic test and diagnostic reference standards.

Quality assessment

The results of quality assessment are present in Table 2. The evaluated items of QUADAS were as follows: representative spectrum, acceptable reference standard, acceptable delay between tests, partial verification avoided, differential verification avoided and incorporation of results were made by blinded investigators. Only one study performed well, receiving a positive assessment of at least 8 of 11 items ⁽²⁸⁾. Our interrater reliability for assessing methodological quality by QUADAS was 93% ($K=0.84$), indicating a good agreement. All disagreements were resolved by consensus.

Diagnostic performance of ProEx-C

Interrater overall agreement between ProEx C activity and the diagnosis in paraffin-embedded was 84% ($K = 0,68$), indicating a good agreement. *Sperman's correlation coefficient test* was -0,3, with $p=0,55$. Pooled sensitivity was 83% (95% IC, 79 to 87) and specificity was 85% (95% IC, 80 to 89) using Meta-Disc[®] ⁽³³⁾. Figure 2 and Figure 3 showed respectively sensitivity and specificity for each study using RevMan 5.0.21 (The Nordic Cochrane Center, Copenhagen, Denmark) ^(33,34). 83% (355/429) of positive biopsies were positive for ProEx C activity, while 14% (41/284) of the negative biopsies were positive for ProEx C activity.

To calculate the pooled post-test probability we used pooled positive and negative LH (with the respective 95% CI) and the proportion of cervical lesion (Table 3). For cervical lesion vs. positive or negative biopsy, the pre-test probability of positive biopsy for a positive result for ProEx C activity increased from 60% to 90% (95% CI = 0,64 -1,16) and decreased to 23% (95% CI= 0,13-

0,33) for negative result. Table 4 shows the contingency tables (false negative, false positive, true positive and true negative) from each study considered. Figure 4 shows the resulting summary ROC curves with operating points for sensitivity and specificity on the curve ($Q^* = 0.84$, and $AUC = 0.90$).

DISCUSSION

In summary, this meta-analysis suggests that ProEx C could be used to improve the diagnostic accuracy of cervical cytology in liquid-based cervical specimens. The sensitivity for detecting atypical squamous cells of undetermined significance or more in cytology with the biomark ProEx C was 83% and specificity was 85%. In 83% (355/429) of positive biopsy were positive for ProEx C activity, while 14% (41/284) of the negative biopsy were positive for ProEx C activity.

It is important to note that a possible limitation of this systematic review is a potential bias in that all trials were retrospective and that there was a lack of blinding in their assessment. There were a small number of trials included and the low quality of some of the trials (nonconsecutive, insufficient population details) ^(35, 36). On the other hand, this meta-analysis complied with the criteria for performing a rigorous systematic review planned a priori ^(18, 21, 22). These included the use of study quality assessment ⁽³⁶⁾ and investigation of homogeneity with fixed and random models to test the robustness of the results ^(14, 15, 16). SROC curves were constructed with calculated the AUC ^(18, 21, 22).

The Pap test is the most effective screening tool for cancer that has ever been devised, and after the introduction of Papanicolaou cervical smear screening, the incidence of cervical cancer has dramatically decreased ^(37, 38). However, cervical cytopathology has limited specificity for an underlying clinically significant lesion in case of low-grade cytologic abnormalities, and more than 3 million women each year will receive an equivocal Pap test result ^(29, 38). This depending on the clinical practice may require HPV testing, colposcopy, or a cervical biopsy to exclude the presence of high-grade dysplasia or squamous cell carcinoma. Histopathological examination is the method of choice to confirm the diagnosis of a squamous intraepithelial lesion (SIL) that is usually first detected by cytological screening ^(39, 40). Histopathologic criteria are

not completely reliable or reproducible in diagnosing and classifying SIL because of the presence of certain pitfalls or mimicking conditions, such as reactive atypia, atrophy, immature squamous metaplasia, small sample size, and tangential sectioning ^(37, 39). In view of this background, additional molecular markers need to be studied to explore their utility in detecting high-grade cervical disease.

We suggest that blinded prospective studies should be performed to investigate the diagnostic accuracy of biomark ProEx C, in view that biomarks may represent a useful ancillary test to assist in the interpretation of cytologically challenging cases.

Conflict of interest statement

We declare no conflict of interest.

Reference List

- (1) Gupta N, Srinivasan R, Raiwanshi A. Functional biomarkers in cervical precancer: an overview. *Diagn Cytopathol* 2010, 38(8): 618-23.
- (2) Conesa-Zamora P, Doménech-Peris A, Ortiz-Reina S, Orntes-Casado FJ, Acosta-Ortega J, et al. Immunohistochemical evaluation of ProEx C in human papillomavirus-induced lesions of the cervix. *Journal of Clinical Pathology* 2010;62:159-162.
- (3) Halloush RA, Akpolat I, Zhai QJ, Schwartz MR, Mody DR. Comparison of ProEx C with p16INK4a and Ki-67 immunohistochemical staining of cell blocks prepared from residual liquid-based cervicovaginal material. *American Cancer Society* 2008;114:474-480.
- (4) Shroyer KR, Homer P, Helnz D, Singh M. Validation of Novel Immunocytochemical Assay for Topoisomerase II- α and Minichromosome Maintenance Protein 2 Expression in Cervical Cytology. *American Cancer Society* 2006;108:324-330.
- (5) Ancuta E, Ancuta C, Zugun-Eloae F, Iordache C, Chireac R, Carasevici E. Predictive value of cellular immune response in cervical cancer. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2009;50 (4):651-655.
- (6) Kelly D, Kincaid E, Fansler Z, Rosenthal DL, Clark DP. Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions from cytology samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx™ C). *Cancer*, 2006; 108 (6): 494-500.
- (7) Oberg TN, Kipp BR, Vrana JA, Bartholet M.K., Fales CJ, et al. Comparison of p16^{INK4a} and ProEx™ C Immunostaining on Cervical ThinPrep Cytology and Biopsy Specimens. *Diagnostic Cytopathology*, 2010;38 (8):564-572.

- (8) Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, et. al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: The STARD initiative. *Ann Intern Med*, 2003; 138 (1): 40-4.
- (9) Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL. Users`guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of the study valid? Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA* , 1994; 271(5): 389-91.
- (10) Limer JG, Mol BW, Heisterkamp S, Bonsel GJ, Prins MH, Van der Meulen JH, et al. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests *JAMA*, 1999; 282(11):1061-6.
- (11) Whiting PF, Weswood ME, Rutjes AW, Reitsma JB, Bossuyt PN, Kleijnen J. Evaluation of QUADAS, a tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *BMC MED RES METHODOL*, 2006, 6:9.
- (12) Altman DG. Some common problems in medical research. In Altman DG, editor. *Practical statistics for medical research*. London: Champan & Hall; 1999.P. 403-9.
- (13) Altman DG. Relation between two continuous variables. In: Altman DG, editor. *Practical statistics for medical research*. London: Champan & Hall; 1999. P. 277-99.
- (14) Schlesselman JJ, Stolley PD. *Case control studies. Design, Conduct, Analysis*. New York: Oxford University Press; 1982. 174-177.
- (15) Reitsma JB, Glas AS, Rutjes AWS, Scholten R, Bossuyt PM, Zwinderman AH. Bivariate analysis of sensitivity and specificity produce informative summary measures in diagnostic reviews. *J Clin Epidemiol* 2005; 58: 982-90.
- (16) Littenberg B, Moses LE, Estimating diagnostic accuracy from multiple conflicting reports. *Med Decis Making* 1993; (13): 313-21.

- (17) Moses LE, Shapiro D, Littenberg B. Combining independent studies of a diagnostic test into a summary ROC curve: data analytic approaches and some considerations. *Sta Med* 1993; 12: 1293-316.
- (18) Deeks JJ. Systematic reviews of evaluation of diagnostic and screening tests. In: Egger M, Smith GD, Altman D, editors. *Systematic Reviews in Health care: Meta-analysis in context*. 2nd ed. London, England: BMJ Publishing; 2001. P. 248-82.
- (19) Gatsonic C, Paliwal P. Meta-analysis of diagnostic and screening test accuracy evaluations: methodologic primer. *AJR AM J roentgenol* 2006; 187: 271-81.
- (20) Leeflang MM, Deeks JJ, Gatsonic C, Bossuyt PM. Cochrane diagnostic test accuracy working group. Systematic reviews of diagnostic test accuracy. *Ann Intern Med* 2008; 149: 889-97.
- (21) Irwing L, Tosteson AN, Gatsonis C, Lau J, Colditz G, Chalmers TC, et al. Guidelines for meta-analyses evaluating diagnostic tests. *Ann Intern Med* 1994. Apr 15; 120(8):667-76.
- (22) Sutton AJ Random effects methods for combining study estimates. In: Sutton AJ AKJDSTSF, editor. *Methods for Meta-Analysis in Medical Reserch*. 1 ed. Chichester: John Wiley; 2000. P.73-86.
- (23) Jellema P, van der Windt DA, Bruinvels DJ, Mallen CD, van der Weyenberg SJ, Mulder CJ, et al. Value of symptoms and additional diagnostic tests for colorectal cancer in primary care. *BMJ* 2010; 340:c1269.
- (24) van der Windt D, Jellema P, Mulder C, Kneepkens F, van der Hors H. Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms. *Jama* 2010; 303: 1738-46.

- (25) Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB. Diagnosis and screening. In: Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB, editors . Evidence-base medicine: how to practice and teach EBM. 3rd ed. London, England: Churchill Livingstone; 2000. P. 67-93.
- (26) Deekes JJ ADBM. Statistical methods for examining heterogeneity and combining results from several studies in meta-analysis. In: Egger M SGAD, editor. Systematic Reviews in Health care: Meta-analysis in context. London: BMJ Publishing; 2001. P. 285-312.
- (27) Zamora J AV, Muriel A, Khan KS, Coomarasamy A. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. BMC Medical Research Methodology 2006;31.
- (28) Beccati MD ,Buriani C, Pedriali M, Rossi S, Neci I. Quantitative Detection of Molecular Markers ProEx C (Minichromosome Maintenance Protein 2 and Topoisomerase IIa) and MIB-1 Liquid-based Cervical Squamous Cell Cytology. American Cancer Society,2008; 114: 196-203.
- (29) Siddiqui MT, Hornaman K, Cohen C, Nassar A. ProEx C immunocytochemistry and high-risk human papillomavirus DNA testing in Papanicolaou tests with atypical squamous cell (ASC-US) cytology. Arch Pathol Lab Med 2008; 132: 1648-52.
- (30) Siddiqui MT, Cohen Cynthia, Nassar A. Detecting High-Grade Cervical Disease on ASC-H Cytology. Role of BD ProEx C and digene Hybrid Capture II HPV DNA Testing. *Am J Clin Pathol* 2008; 130: 765-770.
- (31) Siddiqui MT, Hornaman K, Nassar A., Cohen Cynthia. ProEx C and hr-HPV Test in Patients with ASC-US Diagnosis: A Comparative Analysis in Liquid Based Cytologic Specimens. *Cancer Cytopathology* 2007; 111 (5): 366-367.

- (32) Smidt N, Deeks J, Bossuy P, Gatsonic C. Guide to the contents of a Cochranr review and protocol. *Cochrane Handbook for Systematic Review of Systematic Review of Diagnostic Test Accuracy*: Cochrane Collaboration; March 2011. Avaliable in : < <http://srdta.cochrane.org/handbook-dta-reviews>> [accessed 30.08.11].
- (33) Zamora JAV, Muriel A, Khan KS, Coomarasamy A. Meta-Disc: a software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med Res Methodol* 2006; 6:31.
- (34) Review Manager (RevMan) [Computer program] . Version 5.0. Copenhagen: The Nortic Cochrane Center; 2008 [The Cochrane Collaboration].
- (35) Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL. User's guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of the study valid? Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA* 1994 Feb 2; 271(5): 389-91.
- (36) Lijmer JG, Mol BW, Heisterkamp S, Bossel GJ, Prins MH, van der Meulen JH, et al. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *JAMA* 1999 Sep 15; 282(11): 1061-6.
- (37) SHI J. et al. Evaluation of p16^{INK4a}, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase II α , ProEx C, and p16^{INK4a}/ProEx C in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol*, 2007; 38: 1335-44.
- (38) Shroyer KR, Homer P, Helnz D, Singh M. Validation of Novel Immunocytochemical Assay for Topoisomerase II-alpha and Minichromosome Maintenance Protein 2 Expression in Cervical Cytology. *American Cancer Society* 2006; 108: 324-330.

- (39) Walts AE, Bose S. p16, Ki-67, and BD ProExTM Cimmunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Human Pathology* 2009; 40: 957-964.
- (40) Pintol AP, Tulio S, Cruz OR. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical *Rev Assoc Med Bras* 2002; 48(1): 73-78.

TABLES

Table 1. Participant characteristics and scoring criteria in studies included

Study, Year	Mean age (range)	Period of Study	n	Scoring of study quality
Beccati <i>et al.</i> , ⁽²⁸⁾ 2008	40(19-67)	Not reported	53	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, retrospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient
Siddiqui <i>et al.</i> , ⁽³¹⁾ 2007	Range 18-87 years	Not reported	200	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, retrospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient
Siddiqui <i>et al.</i> , ⁽²⁹⁾ 2008	Not reported	2006-2007	200	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, retrospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient
Siddiqui <i>et al.</i> , ⁽³⁰⁾ 2008	Not reported	2005-2007	100	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, retrospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient
Kelly <i>et al.</i> , ⁽⁶⁾ 2006	Not reported	2004	160	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, retrospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient

Table 2: Results of the evaluation of each study according to QUADAS ⁽³²⁾.

Study, year	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a
Beccati <i>et al.</i> , 2008 ⁽¹⁹⁾ ^b	+	+	+	+	+	+	?	?	+	+	?
Kelly <i>et al.</i> , 2006 ⁽²⁰⁾	+	+	+	+	+	+	?	?	+	-	-
Siddiqui <i>et al.</i> , 2008 ⁽²²⁾	+	+	+	+	+	+	?	?	+	-	-
Siddiqui <i>et al.</i> , 2007 ⁽²³⁾	+	+	+	+	+	+	?	?	+	-	-
Siddiqui <i>et al.</i> , 2008 ⁽²¹⁾	+	+	+	+	+	+	?	?	+	-	-

(+) = no bias; (-) = potential bias; (?) = bias unclear.

^a 1 = representative spectrum; 2 = Acceptable reference standard; 3 = Acceptable delay between test; 4 = Partial verification avoided; 5 = Differential verification avoided; 6 = Incorporation avoided; 7 = Reference standard results blinded; 8 = Index test results blinded; 9 = relevant clinical information; 10 = Uninterpretable results reported; 11 = Withdrawals explained.

^b Study received positive assessment in at least eight of 11 quality items.

Table 3: Summary of positive likelihood ratios (random effects model) ⁽³⁴⁾

Study, year	Positive Likelihood Ratio (95% IC)	Negative Likelihood Ratios (95% CI)
Beccati et al., 2008 ⁽¹⁹⁾	0.97 (0.6-1.4)	1.1 (0.08-17.0)
Kelly <i>et al.</i> , 2006 ⁽²⁰⁾	2.7 (1.8-4.1)	0.4 (0.3-0.6)
Siddiqui <i>et al.</i> , 2008 ⁽²²⁾	4.6 (1.3-15.9)	0.09 (0.04-0.2)
Siddiqui <i>et al.</i> , 2007 ⁽²³⁾	12.2 (6.0-25.0)	0.04 (0.02-0.1)
Siddiqui <i>et al.</i> , 2008 ⁽²¹⁾	9.4 (4.6-19.4)	0.2 (0.2-0.3)
Total	4.1 (01.1-14.8)	0.1 (0.08-0.4)

Values to the calculated post-test probability: Pre-test probability = prevalence = 60%,
 Pre-test Odds = 1/(1-prevalence), Post-test Odds = LH* x pre-test Odds, Post-test
 probability = Post-test Odds/ (1+ Post-test Odds).

Table 4. ProEx C according to diagnosis in Biopsy Results in Women with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance or more in Cytology

Study, year	ProEx C			
	Biopsy positive		Biopsy negative	
	TP	FN	FP	TN
Beccati <i>et al.</i> , 2008 ⁽¹⁹⁾	43	7	3	0
Siddiqui <i>et al.</i> , 2008 ⁽²²⁾	83	7	2	8
Siddiqui <i>et al.</i> , 2007 ⁽²³⁾	105	5	7	83
Siddiqui <i>et al.</i> , 2008 ⁽²¹⁾	81	29	7	83
Kelly <i>et al.</i> , 2006 ⁽²⁰⁾	43	26	22	69
TOTAL	355	74	41	243

Table 5: Accuracy of the biomarker ProEx C in patients with ASC-US, ASC-H and SIL vs positive or negative biopsy

Study, year	N	Sensitivity (95% IC)	Specificity (95% CI)
Beccati et al., 2008 ⁽²⁸⁾	53	86 (73-94)	0 (0-70)
Kelly <i>et al.</i> , 2006 ⁽⁶⁾	160	66 (54-77)	75 (65-84)
Siddiqui <i>et al.</i> , 2008 ⁽³⁰⁾	100	92 (84-96)	80 (44-97)
Siddiqui <i>et al.</i> , 2007 ⁽³¹⁾	200	95 (89-98)	92 (84-96)
Siddiqui <i>et al.</i> , 2008 ⁽²⁹⁾	200	73 (64-81)	92 (84-96)
Pooled	713	83 (79-87)	85 (80-89)

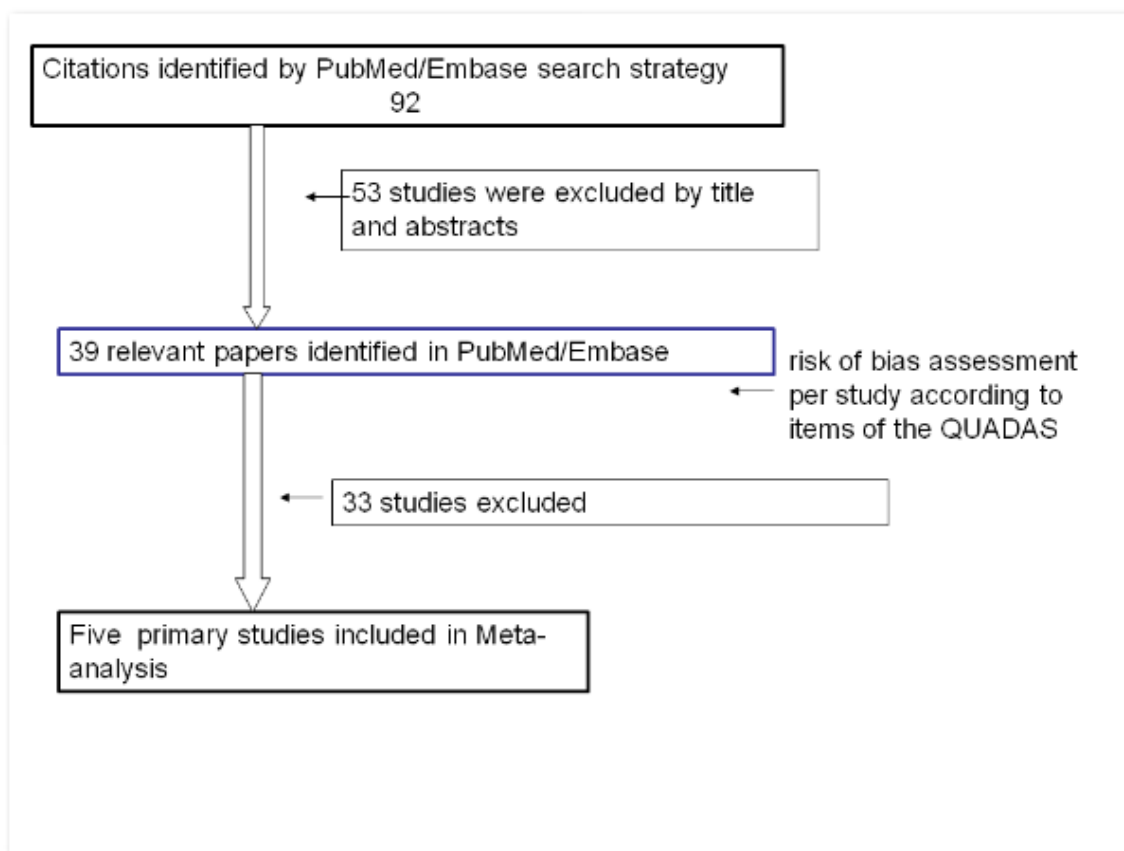


Figure 1: Study selection process

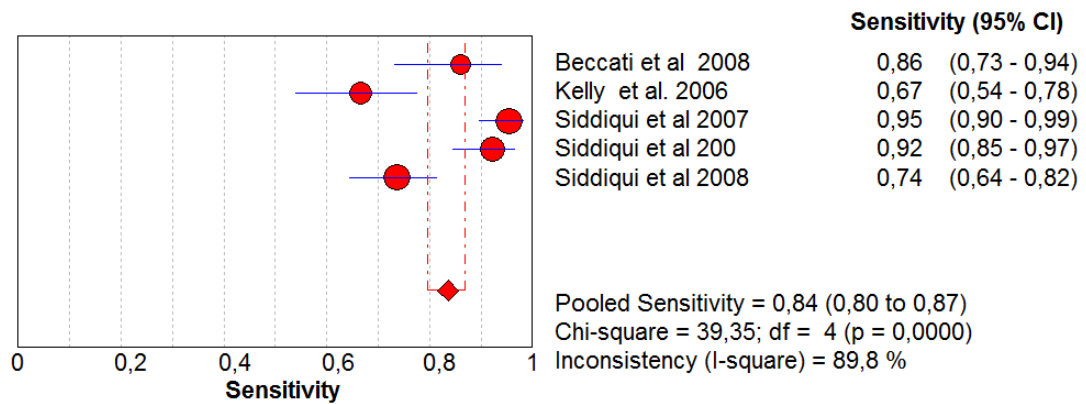


Figure 2: Forest plot of sensitivity

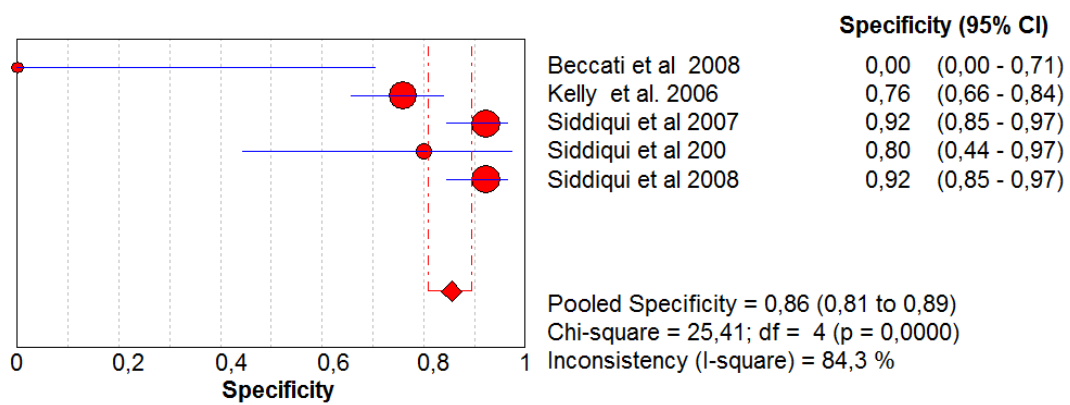


Figure 3: Forest plot of specificity

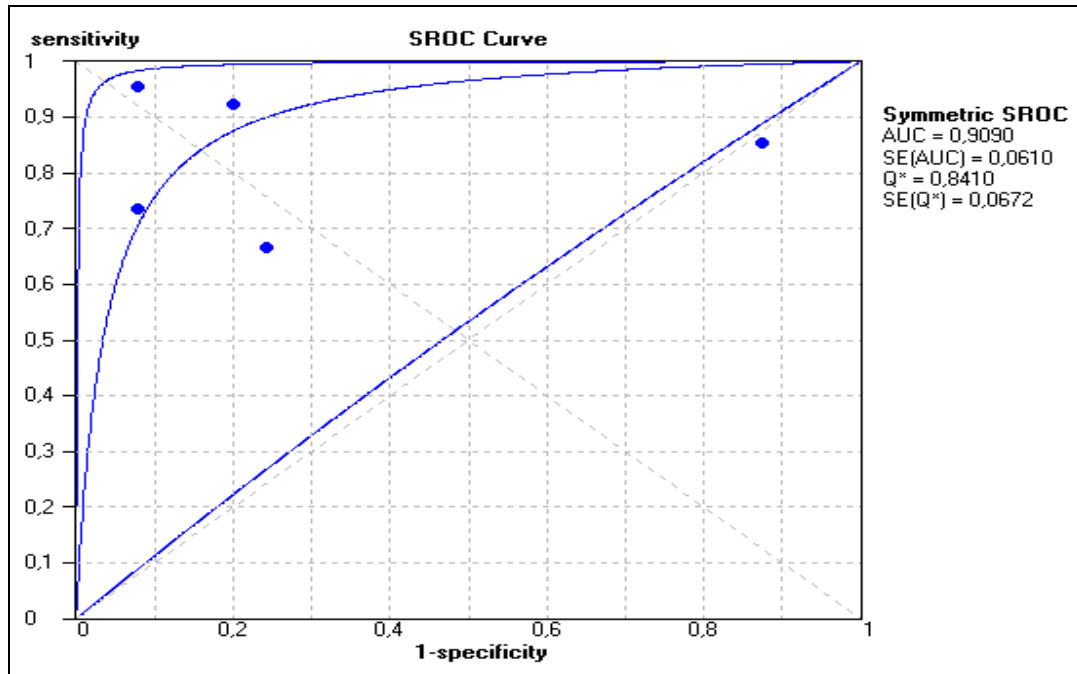


Figure 3. Summary receiver operating characteristic curves

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de colo uterino se configura como um importante problema de saúde pública, principalmente em decorrência da crescente exposição a fatores de risco e da modificação de hábitos de vida da população. Apesar de ser na sua quase totalidade passível de prevenção, o câncer de colo de útero continua a ser uma relevante causa de morte como demonstrado no Brasil, bem como em outros países em desenvolvimento.

Nas neoplasias os biomarcadores podem ser usados para ajudar no diagnóstico da doença, detecção do estadiamento, monitoramento da resposta à terapia e previsão de prognóstico do paciente. Em nosso estudo, avaliamos a acurácia do biomarcador ProEx C em lesões cervicais e nossos dados concordam com a hipótese de que o ProEx C representa um evento precoce na carcinogênese cervical que poderiam estar associados com a iniciação e a progressão de lesões cervicais.

Observamos que em 83% das biópsias positivas foram positivas para ProEx C, enquanto 14% das biópsias negativas foram positivas para ProEx C. O somatório dos estudos para o cálculo de sensibilidade foi de 83% e a especificidade foi de 85%. Para lesão cervical vs biopsia positiva ou negativa, a área sob a curva (AUC) foi de 0,90 com valor do ponto Q* de 0,84, a probabilidade pós-teste positiva foi de 90%.

Esses resultados nos permitem afirmar que o biomarcador ProEx C representa um evento precoce na carcinogênese cervical que poderiam estar associados com a iniciação e a progressão de lesões cervicais. Além disso, o ProEx C pode ser usado como uma ferramenta para ajudar a reduzir as taxas de falso-negativos em amostras citológicas cervicais.

Sugerimos que novos estudos com observadores cegados, prospectivos e de melhor qualidade metodológica devam ser realizados para investigar com maior precisão a acurácia do biomarcador ProEx C, tendo em vista que o uso do biomarcador pode auxiliar na interpretação dos achados cervicais e no diagnóstico das lesões intraepiteliais pré-malignas do colo uterino.

ANEXOS

ANEXO A – Protocolo enviado a Cochrane

ProEx C as a test for improving the detection and management of cervical smear abnormalities

Review number: R002

Authors

Andressa de Azambuja Pias Weber¹, Maria I Edelweiss², Lídia RF Medeiros³,
Guisella de Latorre⁴

¹Post Graduate Program Medical Clinical, University Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

²Pathology, Faculty of Medicine at Federal University of Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

³Social Medicine/Epidemiology, Post-graduation Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴Post Graduate Program Medical Clinical, University Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Background

Cervical cancer is the second most common type of cancer in women worldwide (Gupta, 2010). The implementation of screening programs, like the Papanicolaou (Pap) test have led to a marked reduction in the incidence and mortality of invasive cervical cancer (Kelly, 2006).

Cervical cancer is mainly caused by an infection with a high risk type of human papilloma virus (HPV) (Zegels, 2010). The lower female genital tract (vagina

and ectocervix) is lined with a non keratinized stratified squamous epithelium (Zegels, 2010). The infection of squamous or glandular epithelial cells with HPV causes morphological alterations which lead to the formation of intra-epithelial lesions (Zegels, 2010). The severity of this precancerous condition depends on the extent, on the site it occurs, as well as, on the depth of the infected epithelial layer (Zegels, 2010).

HPV is the leading cause of cervical cancer and studies indicate that HPV DNA can be detected in 99.7% of women with histologically confirmed cervical cancer, (Conesa-Zamora, 2010; Halloush, 2008). Although HPV infections are among the most common sexually transmitted diseases, only a small subset of HPV infections will cause this type of cancer (Conesa-Zamora, 2010). Most cases of HPV infection regress spontaneously. In a minority of cases, the infection persists and may progress to a pre malignant or malignant lesion of the cervical mucosa. The persistence of infection with certain subtypes (mainly 16 and 18) of HPV are associated with the development of cervical cancer (Shroyer, 2006 ; Ancuta 2009).

Over a hundred different HPV types have now been characterized based on nucleotide sequence differences of the viral genome, including over 40 types that have been found to infect the cervical mucosa (Shroyer, 2006). Epidemiologic studies have divided HPV types into “low risk” including HPV 6, 11, 40, 42, 54, 55, 57, MM4, MM7, MM8, and MM9, and “high risk”, including HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, and 68, which have been associated with a higher risk for malignant transformation (Shroyer, 2006).

The Pap test is the most effective screening tool for cancer that has ever been devised, and after the introduction of Papanicolaou cervical smear screening, the incidence of cervical cancer has dramatically decreased (Shi, 2007; Shroyer, 2006). However, cervical cytopathology has limited specificity for an underlying clinically significant lesion in case of low-grade cytologic abnormalities (Shroyer, 2006). Cervical cytologic smears provide an excellent sensitivity for the detection of high grade intraepithelial lesions (HSIL) and low grade intraepithelial lesions (LSIL) (Shi, 2007). Recurring Pap tests contribute to a successful screening program, nevertheless, even with perfect compliance, the system has its limitations because of the interpretive variance, and morphologic

subjectivity. Histopathological examination is the method of choice to confirm the diagnosis of a squamous intraepithelial lesion (SIL) that is usually first detected by cytological screening (Walts, 2009; Pinto, 2008). Detection and grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) using hematoxylin and eosin (H&E) stains alone is limited by intra and interobserver variability. Histopathologic criteria are not completely reliable or reproducible in diagnosing and classifying SIL because of the presence of certain pitfalls or mimicking conditions, such as reactive atypia, atrophy, immature squamous metaplasia, small sample size, and tangential sectioning (Walts, 2009; Shi, 2007). In addition, cervical biopsy is frequently performed to better classify the severity of the squamous lesion and to rule out invasive carcinoma (Shi, 2007; Siddiqui, 2008).

The causal relationship between persistent infection with high risk HPV (HR-HPV) and cervical cancer resulted in the development of methods for detection of HPV (Boulet, 2009). Tests to detect the presence of HPV DNA or RNA, such as in situ hybridization (ISH) and polymerase chain reaction, can increase the sensitivity and may indicate the presence of HPV, but does not provide assessment of the degree of dysplasia (Walts, 2009; Zegels, 2010). Given the high prevalence of transient infections, viral detection has a poor positive predictive value, making it an incomplete method to identify women at risk (Boulet, 2009). Moreover, these tests are labor intensive and performed only in specialized laboratories (Walts, 2009).

A molecular biological marker (biomarker) is a molecular feature that is objectively measured and that serves as an indicator of normal biological or pathogenic processes or pharmacological responses to a therapeutic intervention (Lari, 2011; Buhmeida, 2011). In cancer, biomarkers may be used for disease detection, disease staging, monitoring of disease response to therapy and prediction of patient prognosis (Lari, 2011; Kelly, 2006). A biomarker may be DNA or RNA based or a protein marker measured directly in tissue, serum, or other body fluids (Lari, 2011).

Recent gene expression profiling studies have identified a set of candidate molecular markers that are associated with HSIL (Kelly, 2006). One such biomarker under review is ProEx C (Tripath Imaging, Burlington, NC), which is

an immunocytochemical assay performed on liquid based cytology in biopsy-proven HSIL that has a higher positive predictive value when compared to p16 stain (Gupta, 2010). According to a study by Halloush et al, ProEx C can also be used on cell blocks prepared from residual liquid-based cervicovaginal cytologic specimens (Halloush, 2008).

Target condition being diagnosed

Patients with squamous intraepithelial lesion (ASC-US; LSIL; HSIL) .

Index test(s)

Pap smear or liquid based cytology with positive HPV DNA test

Pap smear or liquid based cytology with positive ProEx C test

Biomarkers allow monitoring of molecular events associated with tumor progression in histological or cytological specimens, they are indicators of physiological status and changes that occur during neoplastic tumor biomarkers can improve the detection of lesions with increased risk of progressing (Termine, 2008). A shortcoming of the current grading system is its reliance on static morphology and microscopic haematoxylin–eosin features of the epithelium alone (Baak, 2006) . In reality, CIN is a dynamic process, and the epithelium may exhibit differing results over time (Baak, 2006) .This emphasizes the need for adjuvant methods to interpret the actual morphological impression of a CIN lesion in dynamic terms rather than in static morphological grades (Gupta, 2010). Such adjunctive methods are also important for better distinction of CIN from non-neoplastic lesions and to predict accurately the risk for progression of low-grade and regression of high-grade CIN lesions (Gupta, 2010).ProEx C is a nuclear stain comprised of monoclonal antibodies for minichromosome maintenance (MCM) and topoisomerase II alpha (TOP2A), two proteins associated with S-phase induction of the cell cycle.(Oberg, 2009). Overexpression of both of these proteins can be observed in cells with human papillomavirus (HPV) infection due to the inactivation of the retinoblastoma protein by the E7 gene of HPV (Oberg, 2009). TOP2a is a nuclear enzyme that unknots and decatenates DNA through an adenosine triphosphate- dependent double-strand break followed by strand passing and relegation (Beccati, 2008).

Over-expression of TOP2a is related to high-risk HPV and is associated significantly with progression from cervical intraepithelial neoplasia 2 (CIN2) to CIN3 (Beccati 2008). It is regulated by retinoblastoma (Rb), and its over-expression may reflect HPV E7-mediated Rb degradation in cervical dysplasia and carcinoma (Beccati 2008). MCM2 is a member of the MCM family of proteins, which are required in an early stage of DNA replication to assemble replication origins and for replication progression as a replicative helicase (Beccati 2008). The current evidence suggests that MCM2, MCM6, MCM7, and TOP2a, m-RNAs are increased in cervical squamous cell carcinoma and cervical adenocarcinoma and that the respective encoded proteins also are over-expressed in cervical dysplasia and carcinoma (Beccati 2008).

ProEx C can be used as an alternative of HPV testing because it can identify cells that have undergone neoplastic transformation and not simply transient viral cytopathic effects.

Alternative test(s)

ProEx C can be used as an alternative of HPV testing because the sensitivity for detecting cervical intraepithelial neoplasia CIN 2 using ProEx C have been reported as high as 99% in some studies (Oberg, 2010).

HPV DNA detection has been extensively evaluated to define its potential role for the triage of patients that have low-grade squamous cytologic abnormalities in order to determine its sensitivity and specificity for underlying CIN-2/3 or squamous cell carcinoma (Shroyer, 2006). Although high-risk HPV detection has been validated for the triage of patients with atypical squamous cell of undetermined significance (ASC-US), HPV detection has not generally been proven to be useful for the triage of patients with LSIL (Shroyer, 2006). The ALTS trial (ASCUS/LSIL Triage Study) found that 83% of LSIL cases were positive for HPVs (low-risk or high-risk types) by the Hybrid Capture (Digene Corp., Gaithersburg, MD) 2 (HC2) assay, although no more than approximately 25% of these cases would be expected to have CIN-2/3 on colposcopic biopsy (Shroyer, 2006). Thus, HPV testing alone did not appear to be useful for the triage of LSIL, due to the high proportion of positive test results relative to the prevalence of underlying high grade CIN (Shroyer, 2006). For example, high-risk HPV DNA testing can segregate women with ASC-US cytology into 2

groups with significantly different risk of HSIL (Kelly, 2006). Women who are negative for high-risk HPV DNA have a low risk of HSIL that is similar to the risk among women who have a cytologic diagnosis of negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM) (Kelly, 2006). The combination of NILM cytology and a negative HPV DNA test may confer such a low risk of HSIL that screening intervals for these women may be increased (Kelly, 2006). Unfortunately, the specificity of a positive HPV DNA test for HSIL is very low (Kelly, 2006). The ideal molecular marker for HSIL would retain the negative predictive value of a negative HPV DNA test but would have greater positive predictive value (Kelly, 2006). Such a marker also would identify cells that have undergone neoplastic transformation and not simply transient viral cytopathic effects (Kelly, 2006). Therefore, it could be clinically useful to identify other molecular diagnostic adjuncts in order to improve the specificity of low-grade cytologic abnormalities for the detection of underlying high grade dysplasia (Shroyer, 2006).

Rationale

Current studies results suggest that ProEx C could be used to improve the diagnostic accuracy of cervical cytology and may be useful to detect underlying HSIL in patients with LSIL in Pap test . This review will study the accuracy of ProEx C in squamous intraepithelial lesion in patients with cervical lesions.

Cervical cytologic smears provide an excellent sensitivity for the detection of cervical HSILs and some LSILs. However, false-negative results of Papanicolaou tests have been reported in up to 30% of cases. Digene Hybrid Capture HPV testing (Digene Corp., Gaithersburg, MD) provides a high sensitivity for the detection of HPV in SILs, but the false-positive rate could be as high as 27%. Because of the high percentages of false-positive results from the initial Papanicolaou test screening, colposcopy/cervical biopsy is still a necessary diagnostic approach to establish a diagnosis of LSIL or HSIL. In addition, cervical biopsy is performed to accurately classify the severity of the SIL and to rule out invasive carcinoma. Unfortunately, histopathologic criteria are not completely reliable in diagnosing and classifying SILs because of the presence of certain pitfalls, such as reactive atypia, atrophy, and immature squamous metaplasia ([Shi, 2007](#)).

Objectives

Primary objectives

In studies where both triage methods (HPV DNA and ProEx C test) were assessed

1. Accuracy of the biomarker ProEx C in patients with ASC-US and SIL
2. Compare the accuracy of ProEx C with other tests: HPV testing, Pap test and cervical biopsy
3. Relative sensitivity and relative specificity of ProEx C compared to cytology

Secondary objectives

To determine the accuracy (specificity and sensitivity) of biomarker ProEx C in women diagnosed with ASC-US, LSIL, HSIL in Pap test or in liquid-based cytology with abnormal colposcopy that had concurrent cervical biopsy.

Investigation of sources of heterogeneity

Sources of heterogeneity will be addressed with the study of certain subgroups such as the:

- Type of cytology used (liquid based or conventional),
- Type of HPV test performed,
- Threshold to call cytology specimen and HPV test positive
- Procedures used for reference standard verification,
- Geographical location of the study

Criteria for considering studies for this review

Types of studies

Observational cohort studies or with cross-sectional design (prospective and retrospective)

We will include studies of women with ASC-US, LSIL, HSIL in Pap test or in liquid-based cytology with alterations in colposcopy that had concurrent biopsy, HPV DNA test and the biomarker ProEx C performed.

We will exclude isolated case report studies.

Participants

Women with positive pap smears or positive liquid based cytology for ASC-US, LSIL, HSIL

Comparing the accuracy of Pap smear or liquid based cytology alone versus Pap smear or liquid based cytology with positive HPV, versus Pap smear or liquid based cytology with positive ProEx C

Index tests

- Pap smear or liquid based cytology with positive HPV DNA test
- Pap smear or liquid based cytology with positive ProEx C test

Comparator tests

Pap smear or liquid based cytology

Target conditions

Patients with ASC-US, LSIL and HSIL

Reference standards

Histological examination

Search methods for identification of studies**Electronic searches**

Searches will be run in MEDLINE, EMBASE, through PubMed Index from 1966 to date, including search terminology for the index tests (Pap smear or liquid based cytology with positive HPV DNA test, Pap smear or liquid based cytology positive ProEx C test) and target condition (Patients with ASC-US, LSIL and HSIL). Detailed search strategies can be found in Appendix 1. No language restrictions will be made.

Searching other resources

The search will be completed manually by searching the reference lists of included papers and by screening the tables of contents of the following journals: International Journal of Gynecological Pathology, Gynecology

Pathology, American Journal of Surgical Pathology, Modern Pathology, Cancer, Cancer Cytopathology, Human Pathology, Journal of Clinical Pathology, American Journal of Clinical Pathology which are journals that, according to previous meta-analysis, will contribute multiple references. The bibliographic database CERVIX of the Unit of Cancer Epidemiology at the Scientific Institute of Public Health (Brussels, Belgium) contains more than 20,000 references, mostly on cervical cancer, and will be used as an additional source.

The Trials Search Co-ordinator of the Cochrane Gynaecological Cancer Review Group will request a search from Sr. Gail Quinn, Managing Editor of Cochrane Gynecological and Orphan Cancer *Review Group*, who is managing and developing the Cochrane Register of Diagnostic Test Accuracy Studies on behalf of The Cochrane Collaboration.

Data collection and analysis

Selection of studies

References will be selected if they fulfil the three mandatory conditions for study selection:

- women with ASCUS, LSIL or HSIL;
- triage testing with ProEx C;
- verification with the reference test.

The fourth selection criterion, triage by repeat cytology as the comparator test, is optional. See Criteria for considering studies for this review. Two review authors (AW, LM) will verify inclusion and exclusion of eligible studies independently and will discuss any discordance. If no consensus can be reached, other review authors will be consulted.

Data extraction and management

We will extract the following study characteristics:

- Study ID.
- Year of publication.
- Published versus unpublished data.
- Language of report.
- Country.
- Settings.

- Design.
- Inclusion and exclusion criteria.
- Patient details - presentations, characteristics, methods of sample selection.
- Definition of cervical cancer.
- Number of patients.
- Index test details:
 - Pap smear or liquid based cytology with positive HPV DNA test
 - Pap smear or liquid based cytology positive ProEx C test

Comparator test details:

Pap smear or liquid based cytology

- True positives, false positives, false negatives, true negatives.
- Adverse events and patient acceptability.

Two independent reviewers will extract these data, using data extraction forms developed for this review. To avoid selection bias, separate 2 x 2 tables will be extracted for all possible cut-off levels, different readers (inter-observer) and multiple observations per reader (intra-observer). All of these will be counted as separate data sets. Data will be extracted, whenever possible, for both unilateral and bilateral disease.

Assessment of methodological quality

The methodological quality of selected studies will be assessed using the QUADAS guidelines(Whiting 2003).For each study, a methodological quality table will be completed. In Table1 the authors explain how the QUADAS items must be understood in terms of triage of women with minor cervical cytology lesions.

Statistical analysis and data synthesis

Separate analyses will be performed for the two triage groups (ASCUS, LSIL) and the two disease thresholds (CIN2+, CIN3+).

Investigations of heterogeneity

Subgroup meta-analysis and multi-variate HSROC regression using METADAS will be performed to verify the influence of study population and test

characteristics (see Investigation of sources of heterogeneity) on the accuracy estimates.

Sensitivity analyses

To verify if conclusions are robust over all subcategories, as defined through different classification systems, the authors will perform subgroup meta-analyses. The following subgroup analyses are foreseen: triage of atypical squamous cells (ASC-US, ASC-H), and atypical glandular cells (AGC/AGUS) (see Assessment of methodological quality: other co-variables; and the list of abbreviations in Appendix 2). As explained earlier (see Target conditions), CIN3 is a more reliable outcome than CIN2 and is less affected by reference standard misclassification. The consistency in accuracy for both outcomes will be assessed.

Assessment of reporting bias

The effective sample size funnel plot and associated regression test of asymmetry will be used to detect publication bias (Deeks 2005). These approaches are more appropriate in systematic reviews of diagnostic tests than the standard tests developed to detect publication bias in meta-analyses of randomised trials of healthcare interventions. It has been shown that the rank correlation test (Begg 1994) and the asymmetry regression test (Egger 1997) suffer from serious degrees of bias when applied to test accuracy studies (Deeks 2005).

References to studies

Ancuta 2009

E. Ancuta, Codrina Ancuta, F. Zugun-Eloae, Cristina Iordache, Rodica Chireac, E. Carasevici. Predictive value of cellular immune response in cervical cancer. Romanian Journal of Morphology and Embryology 2009;50 (4):651-655. [PubMed: 19942961]

Beccati 2008

Maria Doantella Beccati, Carolina Buriani, Massimo Pedriali, Sonia Rossi, Italo Nenci. Quantitative Detection of Molecular Markers ProEx C (Minichromosome Maintenance Protein 2 and Topoisomerase IIa) and MIB-1 Liquid-based Cervical Squamous Cell Cytology. American Cancer Society 2008;114:196-203. [PubMed: 18442059]

Begg, 1994

Begg CB, Mazumdar M. Operating characteristics of a rank correlations test for publication bias.. Biometrics 1994;55 (4):1088-101. [PubMed: 7786990]

Boulet, 2009

Gaëlle A.V. Boulet, Ina H. Benoy, Christophe E. Depuydt. Human Papillomavirus 16 Load and E2/E6 Ratio in HPV 16-Positive Women: Biomarkers for Cervical Intraepithelial Neoplasia ≥ 2 in a Liquid-Based Cytology Setting ? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009;18(11):2992-9. [PubMed: 19861526]

Buhmeida, 2011

Abdelbaset Buhmeida, Peer Zada Abdul Ali. Biomarkers in cancer: is "omics" the way to go. Libyan J Med 2011;6:5982. [PubMed: 21526044]

Conesa-Zamora, 2010

P Conesa-Zamora, A Doménech-Peris, S Ortiz-Reina, F J Orntes-Casado, J Acosta-Ortega, J García-Solano, M Pérez-Guillermo. Immunohistochemical evaluation of ProEx C in human papillomavirus-induced lesions of the cervix. Journal of Clinical Pathology 2010;62:159-162. [PubMed: 18930984]

Deeks, 2005

The performance of tests of publication bias and other sample size effects in systematic reviews of diagnostic test accuracy was assessed. Journal of Clinical Epidemiology 2005;58 (9):882-93. [PubMed: 16085191]

Egger, 1997

Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. BMJ 1997;315 (7):629-35. [PubMed: 9310563]

Gupta, 2010

Nalini Gupta, Radhika Srinivasan, Arvind Rajwanshi. Functional Biomarkers in Cervical Precancer: An Overview. *Diagnostic Cytopathology* 2010;38(8):01-06. [PubMed: 199441372]

Halloush, 2008

Ruba A. Halloush, Ilkeser Akpolat, Qihui Jim Zhai, Mary R. Schwartz, Dina R. Mody. Comparison of ProEx C with p16INK4a and Ki-67 immunohistochemical staining of cell blocks prepared from residual liquid-based cervicovaginal material. *American Cancer Society* 2008;114:474-480. [PubMed: 19016301]

Kelly, 2006

Deidra Kelly, Erik Kincald, Zoya Fansler, Dorothy L. Rosenthal, Douglas P. Clark. Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesion from cytologic samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx™ C). *American Cancer Society* 2006;108:494-500. [PubMed: 17063495]

Lari, 2011

Sara A. Lari, Henry M. Kuerer. Biological markers in DCIS and Risk of Breast recurrence: A Systematic Review. *Journal of Cancer* 2011;2:232-261. [PubMed: 21552384]

Oberg, 2010

Trynda N. Oberg, Benjamin R. Kipp, Julie A. Vrana, Mary K. Bartholet, Colleen J. Fales, Rocio Garcia, Ashley N. McDonald, Brittany L. Rosas, Michael R. Henry, Amy C. Clayton. Comparison of p16^{INK4a} and ProEx™ C Immunostaining on Cervical ThinPrep Cytology and Biopsy Specimens. *Diagnostic Cytopathology* 2010;38(8):564-572. [PubMed: 19937941]

Pinto, 2008

Alvaro P Pinto, Nicolas F Schlecht, Terri YC Woo, Christopher P Crum, Edmund S Cibas. Biomarker (ProEx™ C, p16^{INK4A}, and MiB-1) distinction of high-grade squamous intraepithelial lesion from its mimics. *Modern Pathology* 2008;21:1067-1074. [PubMed: 18552822]

Shi, 2007

Jianhui Shi, Haiyan Liu, Myra Wielkerson, Yajue Huang, Steven Meschter, Willian Dupree, Conrad Schuerch, Fan Lin. Evaluation of p16INK4a, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase II alpha, ProEx C, and p16 INK4a/ProEx C in cervical squamous intraepithelial lesions. *Human Pathology* 2007;38:1335-1344. [PubMed: 19442790]

Shroyer, 2006

Kenneth R. Shroyer, Petra Homer, David Helnz, Meenakshi Singh. Validation of Novel Immunocytochemical Assay for Topoisomerase II-alpha and Minichromosome Maintenance Protein 2 Expression in Cervical Cytology. *American Cancer Society* 2006;108:324-330. [PubMed: 16937378]

Siddiqui, 2008

Momin T. Siddiqui, Kelly Hornaman, Cynthia Cohen, Aziza Nassar. ProEx C Immunocytochemistry and High-Risk Human papillomavirus DNA Testing in Papanicolaou Test With Atypical Squamous Cell (ASC-US) Cytology. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:1648-1652. [PubMed: 18834224]

Walts, 2009

Ann E. Walts, Shikha Bose. p16, Ki-67, and BD ProExTM C immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Human Pathology* 2009;40:957-964. [PubMed: 19269017]

Whiting, 2003

Whiting P, Rutjes AWS, Reitsma JB, Bossuyt PM, Kleijnen J.. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Medical Research Methodology* 2003;3 (25):1-13. [PubMed:]

Zegels, 2010

Geert Zegels, Geert AA Van Raemdonck, Wiebren AA Tjalma, Xaveer WM Van Ostade. Use of cervicovaginal fluid for the identification of biomarkers for

pathologies of the female genital tract. BioMed Central 2010. [PubMed: 21143851]

Additional tables

Table 1. Participant characteristics and scoring criteria in studies included

Study, Year	Mean age (range)	Period of Study	n	Scoring of study quality
Beccati <i>et al.</i> , ⁽²⁸⁾ 2008	40(19-67)	Not reported	53	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, retrospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient
Siddiqui <i>et al.</i> , ⁽³¹⁾ 2007	Range 18-87 years	Not reported	200	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, retrospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient
Siddiqui <i>et al.</i> , ⁽²⁹⁾ 2008	Not reported	2006-2007	200	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, retrospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient
Siddiqui <i>et al.</i> , ⁽³⁰⁾ 2008	Not reported	2005-2007	100	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, retrospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient

Kelly <i>et al.</i> , ⁽⁶⁾ 2006	Not reported	2004	160	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, retrospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient
---	-----------------	------	-----	--

Appendices

MEDLINE search strategy

- 1 Uterine Cervical Neoplasms/
- 2 Uterine Cervical Dysplasia/
- 3 Cervical Intraepithelial Neoplasia/
- 4 (cervi* adj3 (cancer* or tumo?* or neoplas* or malignan* or carcinoma* or adenocarcinoma* or dysplas*)).tw,ot.
- 5 (CIN or CINII* or CIN2 or CIN3 or SIL or LSIL or HSIL or "H SIL" or "L SIL" or ASCUS or "AS CUS").tw,ot.
- 6 1 or 2 or 3 or 4 or 5
- 7 Precancerous Conditions/
- 8 Early Detection of Cancer/
- 9 Carcinoma, Squamous Cell/
- 10 Neoplasms, Squamous Cell/
- 11 (squamous adj3 lesion*).tw,ot.
- 12 (precanc* or premalignan* or precursor or preneoplas*).tw,ot.
- 13 7 or 8 or 9 or 10 or 11 or 12
- 14 Cervix Uteri/
- 15 cervi*.tw,ot.
- 16 14 or 15
- 17 13 and 16
- 18 6 or 17
- 19 ("Proe?x? C" or "p16?Proe?x? C").tw,ot.

- 20 exp Tumor Markers, Biological/
- 21 Biological Assay/
- 22 (biomarker* or bioassay*).tw,ot.
- 23 ((biologic* or molecular or tumo?r or neoplas*) adj5 marker*).tw,ot.
- 24 ((immunocytochemi* or immunohistochemi*) adj3 assay*).tw,ot.
- 25 20 or 21 or 22 or 23 or 24
- 26 exp "Sensitivity and Specificity"/
- 27 (sensitivit* or specificit*).tw,ot.
- 28 predictive value*.tw,ot.
- 29 di.fs.
- 30 an.fs.
- 31 Reagent Kits, Diagnostic/
- 32 26 or 27 or 28 or 29 or 30 or 31
- 33 25 and 32
- 34 19 or 33
- 35 18 and 34

List of abbreviations

- ALTS: ASCUS-LSIL Triage Study
- ASC: atypical squamous cells (comprises ASC-US and ASC-H)
- ASC-US: atypical squamous cells of undetermined significance
- CIN: cervical Intra-epithelial neoplasia
- CIS: carcinoma in situ
- DNA: desoxyribo-nucleic acid
- HPV: human papillomavirus
- HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion
- LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion
- Pap test : Papanicolaou test
- SIL:squamous intraepithelial lesion
- ProEx C: Tripath Imaging
- H&E: hematoxylin and eosin

ISH: in situ hybridization

TOP2a: topoisomerase IIa

MCM2: minichromosome maintenance protein-2

Rb: retinoblastoma

m-RNA: messenger RNA

SCC:squamous cell carcinoma

NILM: negative for intraepithelial lesion or malignancy

NPV: negative predictive value

PPV: positive predictive value