

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

Alexandre da Silva Rocha

Expressão do Anticorpo Anti-p16ink^{4a} em Citologia Cervical

Porto Alegre, dezembro de 2006

Alexandre da Silva Rocha

Expressão do Anticorpo Anti-p16ink^{4a} em Citologia Cervical

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas junto ao programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora: Prof. Dra. Mary Clarisse Bozzetti
Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre, dezembro de 2006

R672e **Rocha, Alexandre da Silva**

Expressão do anticorpo anti-p16ink^{4a} em citologia cervical / Alexandre da Silva Rocha ; orient. Mary Clarisse Bozzetti ; co-orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – 2006.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006. p117

1. Citodiagnóstico 2. Doenças do colo do útero 3. Técnicas de diagnóstico obstétrico e ginecológico 4. Anticorpos monoclonais 5.

Anticorpo anti-p16ink^{4a} I. Bozzetti, Mary Clarisse II. Edelweiss,

Maria Isabel Albano III. Título.

NLM: WP 141

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Dedicatória

Dedico esta dissertação àqueles que me acompanharam
dedicada e incansavelmente até este momento:

Guilherme e Maria, pais

Simone, irmã

Lísia, noiva

Agradecimentos

Agradeço a todos que perceberam minhas hesitações, dúvidas, descrenças, indecisões e suspeitas e insistiram para que este momento chegasse:

Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss e Dra. Mary Clarisse Bozzetti, incansáveis no apoio e orientação. Meu especial muito obrigado.

Ao Corpo técnico do Laboratório de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório Edelweiss. Gentis, capazes e dedicados na assistência e resolutividade.

Aos funcionários da Unidade Básica de Saúde Bananeiras / Gerência Distrital de Saúde Partenon – Lomba do Pinheiro parceiros diários no *front* da pesquisa.

Epígrafe

“Até o mais seguro dos homens e a mais confiante das mulheres já passaram por um momento de hesitação, por dúvidas enormes e dúvidas mirins, que talvez nem merecessem ser chamadas de dúvidas, de tão pequenas. Vacilos seria melhor dizer... Em tempos em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, suspeitas, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco de sua energia conosco, insistindo”
Lia Luft.

Resumo

Introdução: Desde a introdução do exame citológico cervical, em forma de programa de rastreamento populacional, que a morbidade e a mortalidade do câncer da cérvix vêm decrescendo. Considerado hoje como *medida fortemente recomendada* para mulheres sexualmente ativas, mostra desapontadoras sensibilidades médias no diagnóstico de alterações neoplásicas ou pré-neoplásicas cervicais. **Justificativa:** Dentre as várias alternativas diagnósticas em cérvix, o uso de anticorpos monoclonais no exame citológico cervical, como o anti-p16ink^{4a}, vêm se mostrando útil no incremento da sensibilidade diagnóstica. Entretanto há carência de estudos utilizando o anticorpo em citologias coletadas na forma convencional (não meio-líquido) e associadas ao exame padrão-ouro cervical (biópsia dirigida por colposcopia). **Objetivos:** Avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do anticorpo anti-p16ink^{4a} em citologia cervical coletada na forma convencional. Avaliar a variação inter-observador na leitura das lâminas de citologia coradas com o anticorpo. **Método:** Estudo de casos e controles realizado em ambulatório de patologia cervical. As lâminas de citologia, para imunocitoquímica com o anticorpo, foram coletadas com espátula de Ayre e escova tipo *cytobrush*. A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas independentes (P1 e P2). Foram considerados casos (n=61), as investigações cervicais que resultaram em biópsia diagnóstica compatível com lesão intra-epitelial de baixo grau (NIC 1), alto grau (NIC 2/3) ou carcinoma (CA). Foram considerados controles (n=87), as investigações que contavam com colposcopia normal e citologia, corada pelo método de *Papanicolaou*, negativas. **Resultados:** A sensibilidade para o diagnóstico das NIC 2/3 (n=23) foi de 100% (P1) e 95,7% (P2). Já o valor preditivo negativo nos diagnósticos de NIC 2 ou pior foi de 100 (P1) e 98,9 (P2). Nos dois casos de carcinoma epidermóide, a sensibilidade foi de 100% para ambos patologistas. A sensibilidade para o diagnóstico das NIC1 foi de 77,8% (P1)

e 58,3% (P2). O valor preditivo negativo entre as NIC1 foi de 90,6 (P1) e 82,0 (P2). O índice kappa entre os dois patologistas foi de 0,74. Entre os casos de NIC 2/3 associado à positividade nuclear ao anticorpo, a diferença percentual entre os patologistas foi inferior a 5%; mesmo escore encontrado entre os casos de ausência de lesão cervical e negatividade para o anticorpo. Já entre as portadoras de NIC1, houve maior variação inter-observador. **Conclusões:** Os resultados apresentados apontam o anticorpo anti-p16ink^{4a} como auxiliar no rastreamento de lesões precursoras ou neoplásicas em citologia cervical.

Abstract

Introduction: Since the cytological cervical testing was introduced as a populational screening program, cervical cancer morbidity and mortality has decreased. Nowadays it is considered to be a *strongly recommended* screening test for the diagnosis of neoplastic abnormalities or cervical pre-neoplastic lesions. **Justification:** Among the various alternatives for the diagnosis of cervical cancer, the use of monoclonal antibodies in the cytological cervical test, such as the antibody anti-p16ink^{4a}, has shown increase the sensitivity of the cytological examination. However, there is a lack of studies using the monoclonal antibody in cervical cytology linked to the histological examination of the uterine cervix. **Objectives:** To evaluate sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the anti-p16ink^{4a} in conventional sampled cervical cytology. To evaluate the inter-observer variation in reading of slides marked with the antibody. **Method:** A case-control study was carried out in a cervical pathology reference center. The cytology slides, submitted to the immunocytochemistry for the diagnostic antibody, were conventionally sampled with *Ayre's* spatula and *Cytobrush*. The slides were read by two independent pathologists (P1 and P2). Cases (n=61) were all cervical investigations that had resulted in compatible diagnostic biopsy with CIN 1, CIN 2/3 or carcinoma. Controls (n=87), included all investigations presenting *Papanicolaou* cytology and colposcopy negative. **Results:** Sensitivity for the histological diagnosis of CIN 2/3 (n=23) was 100% and 95.7% for P1 and P2, respectively. The negative predictive value on the CIN 2/3 was 100% (P1) and 98.6% (P2). In two cases of squamous carcinoma, sensitivity was 100%, for both pathologists. Sensitivity for the diagnosis of CIN 1 was 77.8% (P1) and 58.3% (P2). The negative predictive value for CIN 1 was 90.6% (P1) and 83% (P2). The kappa index between the two pathologists was 0.74. Among the cases of CIN 2/3 associating the nuclear positivity to the antibody, the difference between pathologists was inferior to 5%. Exactly the

same scores were found among cases of absence of cervical lesion and negativity for the antibody. On the other hand in CIN 1 patients there was a greater inter-observer variation.

Conclusions: Our results suggest that the antibody anti-p16ink^{4a} could contribute as an adjuvant tool in the screening of pre-neoplastic and neoplastic lesions in conventional sampled cervical cytology.

Figuras

Figura 1	Ciclo celular normal	pág. 26
Figura 2	Ponto de controle G1 – S	pág. 27
Figura 3	Ciclo celular sob ação da proteína E7 do HR-HPV	pág. 29
Figura 4	Fluxograma do processo de seleção da amostra	artigo inglês - pag. 53 artigo português – pag. 80
Figura 5	<i>Performance</i> do anticorpo anti-p16ink ^{4a} de acordo com o resultado da investigação	artigo inglês - pag. 62 artigo português – pag. 90
Figura 6	Exemplos de positividade ao anticorpo anti-p16ink ^{4a}	pág. 99

Tabelas

Tabela 1	Variáveis sócio-demográficas da amostra	artigo inglês - pág. 59 artigo português - pág. 86
Tabela 2	Resultados da colposcopia de acordo com o diagnóstico histológico cervical	artigo inglês - pág. 60 artigo português - pág. 87
Tabela 3	Expressão do anticorpo anti-p16ink ^{4a} na amostra	artigo inglês - pág. 61 artigo português - pág. 89
Tabela 4	Citologia cervical com o anticorpo anti-p16ink ^{4a} : sensibilidade e especificidade	artigo inglês - pág. 63 artigo português - pág. 91
Tabela 5	Citologia cervical com o anticorpo anti-p16ink ^{4a} : valores preditivos positivo e negativo	artigo inglês - pág. 64 artigo português - pág. 92
Tabela 6	Resultado conjunto entre as citologias <i>Papanicolaou</i> e ICQ com o anticorpo anti-p16ink ^{4a}	artigo inglês - pág. 65 artigo português - pág. 93
Tabela 7	Associação das citologias <i>Papanicolaou</i> e ICQ para o diagnóstico de lesões cervicais	artigo inglês - pág. 66 artigo português - pág. 94

Abreviaturas e Siglas

AGC	Atypical glandular cells
ASC-H	Atypical squamous cells in which a high grade lesion cannot be excluded
ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significance
CA	Carcinoma
CDK	Cyclin-dependent kinase
DNA	Desoxirribonucleic acid
DST	Doença sexualmente transmissível
Fase G1	Fase pré-síntese de DNA no ciclo celular
Fase G2	Fase pré-mitose do ciclo celular
Fase M	Fase de mitose do ciclo celular
Fase S	Fase de síntese de DNA no ciclo celular
HE	Hematoxilina e eosina
HIV	Human immunodeficiency virus
HPV	Human papillomavirus
HR-HPV	High risk human papillomavirus
H-SIL	High-grade squamous intraepithelial lesion
ICQ	Imuno-citoquímica
LR-HPV	Low risk human papillomavirus
LSAB	Labeled streptavidin biotin
L-SIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion

NIC 1	Neoplasia intra-epitelial cervical grau 1
NIC 2	Neoplasia intra-epitelial cervical grau 2
NIC 3	Neoplasia intra-epitelial cervical grau 3
PCNA	Proliferating cell Nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
pRb	Retinoblastoma protein
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida

Sumário

Introdução	pág. 15
Justificativa	pág. 34
Objetivo geral	pág. 34
Objetivo específico	pág. 34
Referências bibliográficas da dissertação	pág. 36
Artigo científico em inglês	pág. 48
Referências bibliográficas do artigo científico (inglês)	pág. 70
Artigo científico em português	pág. 74
Referências bibliográficas do artigo científico (português)	pág. 101
Conclusões	pág. 105
Considerações finais e perspectivas	pág. 106
Anexos	
Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	pág. 108
Anexo B - Documento de Inclusão no Estudo	pág. 110
Anexo C - Técnica LSAB para imunocitologia	pág. 111
Anexo D - Técnica de <i>Papanicolaou</i>	pág. 112
Anexo E - Classificação Citológica de Bethesda 2001	pág. 113
Anexo F - Classificação Colposcópica da Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia	pág. 115
Anexo G - Critérios de Richart para o diagnóstico histopatológico cervical	pág. 117

Introdução

Desde a introdução do exame citológico cervical em forma de programa de rastreamento populacional, que a morbidade e a mortalidade do câncer da cérvix vêm decrescendo¹. Os estudos pioneiros de George Papanicolaou (1883 - 1962) resultaram na publicação da monografia *Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear* em 1941² onde técnica simples de coleta de células cervicais, para exame sob microscopia, era sugerida como forma diagnóstica precoce de alterações epiteliais³. A introdução do exame citológico cervical em escala populacional, já a partir da década de sessenta⁴, seu grande sucesso, simplicidade e baixo custo vem rendendo distinção de medida fortemente recomendada para mulheres sexualmente ativas (e que possuam a cérvix) com o objetivo diagnóstico precoce de alterações epiteliais⁵.

O exame citológico cervical, idealizado para possuir grande sensibilidade e especificidade no diagnóstico de alterações cervicais, mostrou-se deficiente nesse objetivo já na década de setenta. Em 1977, após investigação governamental nos Estados Unidos da América, motivado pela baixa acurácia do exame em laboratório contratado pela Força Aérea daquele país, resultou na primeira publicação de resultados conflitantes para a citologia cervical⁶. Atualmente diversas falhas na execução do exame citológico cervical vêm sendo descritas como determinantes da baixa acurácia: erro na coleta, fixação, transporte e na leitura da lâmina de citologia; número inadequado de células diagnósticas, além da presença de sangue, esperma e exsudato inflamatório no esfregaço⁷. A conclusão de inúmeros estudos é que o exame citológico do colo uterino é menos sensível do que se imaginava; sua acurácia será grandemente influenciada pela prevalência da doença cervical no grupo em avaliação. A sensibilidade, segundo alguns autores, seria de 0,51 (IC 95% 0,37 - 0,66) e sua especificidade 0,98 (IC 95% 0,97 - 0,99), sendo mais acurado entre lesões cervicais de alto grau⁸⁻¹⁰.

Situação no Brasil

Durante os anos de 1999 a 2001 foram aplicados aproximadamente 135 milhões de reais em ações do Programa Viva Mulher do Ministério da Saúde no Brasil (que incluíram coleta, exames citológicos, anátomo-patológicos de biópsias do colo uterino e cirurgia de alta frequência). Nesse período, foram realizados 23 milhões de exames citológicos pela rede pública nacional do Sistema Único de Saúde¹¹. Na segunda fase de intensificação do Programa Viva Mulher, durante o ano de 2002, houve a realização de 3.8 milhões de novos exames (Programa Nacional de Controle de Câncer de Colo do Útero)¹². No estado do Rio Grande do Sul, durante o mesmo período, foram realizados mais de dois milhões de novos exames, sendo que na última fase de intensificação, durante o ano de 2002, foram coletados aproximadamente 710 mil exames¹³. No Município de Porto Alegre, durante o período de 2000 a 2004, foram realizados aproximadamente 795 mil exames citológicos cervicais em regime denominado de “extra-teto” onde, mesmo que ultrapassada a quota contratada inicialmente, novos exames foram processados. Esta medida foi adotada visando manter cobertura de coletas inalterada durante o período¹⁴.

Câncer da cérvix

A prevalência do câncer cervical no continente americano, varia de noventa e quatro casos em 100.000 mulheres Haitianas até oito casos em 100.000 mulheres Canadenses¹⁵. No Brasil esperam-se, para o ano de 2006, aproximadamente 19.000 novos diagnósticos de câncer cervical, tendo média de vinte casos para cada 100.000 mulheres. No estado do Rio Grande do Sul, estimam-se, para o ano corrente, trinta e dois casos para cada 100.000 mulheres ou 1730

novos diagnósticos de câncer cervical; já no Município de Porto Alegre, 260 novos casos deste tumor¹⁶. Quanto aos óbitos, no estado do Rio Grande do Sul por câncer da cérvix, ocorreram aproximadamente 300 óbitos/ano nos registros de 1997 a 2003. No mesmo período, no município de Porto Alegre houve, em média, 57 óbitos anuais por este tumor¹³. Quanto às idades dos óbitos percebe-se que nos anos de 2002 e 2003 concentrou-se na faixa dos 30 aos 69 anos, abrangendo desde a menacme até peri-menopausa¹³.

O exame citológico cervical

O rastreamento populacional a partir da citologia cervical é baseado na premissa que as lesões do colo uterino são passíveis de esfoliação, possuem desenvolvimento gradual e, na maioria das pacientes, evoluem de lesões precursoras até o câncer da cérvix¹⁷.

A adequada anamnese executada previamente à coleta do exame citológico e o estabelecimento de fatores de risco para lesão cervical, torna-se elemento adjuvante ao rastreamento:

a) Número de parceiros sexuais na vida e nos últimos 6 meses, consumo freqüente de álcool e promiscuidade do parceiro, na tentativa de identificação de casos expostos a agentes sexualmente transmissíveis como o papilomavírus humano (HPV)¹⁸.

b) Identificação da vulnerabilidade social como baixo nível educacional e renda familiar *per capita*, além da identificação de paridade elevada¹⁹.

c) Quanto ao hábito de fumar, a presença de substâncias derivadas da inalação do cigarro em concentrações elevadas nos tecidos cervicais^{20, 21} e a suspeita de alterações do DNA dos mesmos tecidos entre as fumantes²², sugere o cigarro como tendo efeito aditivo ao HPV na transformação neoplásica do colo^{23, 24}.

d) Destacar a possibilidade de comprometimento imunitário da paciente que,

sabidamente, é fator que favorece o aparecimento de lesões precursoras na cérvix, como o uso de drogas com efeito imunossupressor²⁵ e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)²⁶. Desde 1993, o câncer cervical é indicador da Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) entre aquelas portadoras do vírus HIV, havendo alta prevalência de lesões precursoras entre as pacientes mais comprometidas na imunidade celular²⁷.

A adequada exposição da cérvix e a coleta do exame citológico de forma padronizada tornam-se elementos indispensáveis para o diagnóstico: espéculo proporcional, iluminação apropriada e observação de contra-indicativos à coleta como exsudato inflamatório, sangue ou espermatozoides em fundo vaginal. Adequada amostragem de toda a zona de transformação da cérvix é obtida com escova *cytobrush* (rotação de 90°) e espátula de Ayre, evitando espátulas tipo *Broom* ou o *cotton swab*²⁸.

No momento da preparação da lâmina, tentar distribuição homogênea do esfregaço e imediata fixação, lembrando que, em média, apenas 20% das células coletadas serão depositadas na lâmina de exame e de forma não randômica²⁹. Fato intrínseco de algumas lesões cervicais é a “resistência” à descamação durante a coleta, sugerindo que moléculas de adesão tecidual tipo as *e-caderinas* colaborem como responsáveis, contribuindo para os falso-negativos do exame citológico cervical³⁰.

Com exames citológicos cervicais adequadamente coletados, transportados e interpretados em intervalos de até cinco anos, poderemos prevenir o câncer da cérvix em 64% das vezes, com adicional proteção de 18%, caso o intervalo das coletas seja reduzido para 3 a 5 anos³¹.

Os critérios morfológicos celulares serão a base para o diagnóstico das lesões cervicais na citologia; entretanto, a anormalidade morfológica poderá não ser suficientemente distinta a ponto de rápida identificação, podendo estar presente em raras células do esfregaço e ser passível de confusão com alterações benignas celulares³².

Lâminas de citologia cervical, amostradas entre casos de lesão intra-epitelial de alto grau, que possuam menos de cinquenta células representativas da lesão, difusamente distribuídas e com a perda da hiper cromasia nuclear típica, possuirão significativo erro diagnóstico associado³³⁻³⁵. Estima-se que o diagnóstico falso-negativo na citologia cervical deva-se a erros de leitura em 20 a 50% das vezes³⁶.

Verifica-se que, mesmo em países com coberturas de coletas ultrapassando 85%, metade dos casos de câncer cervical ocorram em mulheres que não foram testadas nos últimos cinco anos e, entre as testadas, 12 a 23% possuam falhas no rastreamento³⁷. Estima-se que 2/3 das falhas do exame citológico cervical sejam devidos a coleta inadequada e 1/3 devidos a erros laboratoriais³⁸⁻⁴⁰. Entre aquelas diagnosticadas como portadoras de câncer cervical, a revisão de seus exames citológicos “normais”, ocorridos nos três últimos anos, sejam reclassificados para lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (H-SIL) em 40% das vezes⁴¹. Em países desenvolvidos, a revisão histórica dos exames de rastreamento, entre aquelas portadoras de câncer cervical, apontará que as mais jovens foram examinadas em intervalos recentes ao diagnóstico da neoplasia, portanto, com falsos negativos ou com evolução rápida da doença. Já entre as mais idosas, há longos intervalos entre o último rastreamento e o diagnóstico neoplásico⁴².

A qualidade da leitura das lâminas de citologia cervical poderá ser grandemente influenciada pela fadiga do examinador e a experiência no diagnóstico das alterações celulares menores no esfregaço. Já em 1988, visando controle de qualidade e certificação dos laboratórios nos Estados Unidos da América, foi publicado o CLIA/88 (*Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988*), onde se destacava a quota máxima da leitura de 100 lâminas/dia além da releitura das lâminas diagnosticadas como alteradas e de 10% das lâminas inicialmente diagnosticadas como normais.

Visava evitar o fenômeno da “habituação”, onde, após a visualização de centenas de

campos microscópicos normais, o examinador encontrava-se dessensibilizado para a localização de células anormais no esfregaço^{43, 44}.

Mais recentemente o *College of American Pathologists* lançou o programa de acreditação dos laboratórios de patologia que associou novos itens ao controle de qualidade para o diagnóstico em citologia cervical. Este programa enfocou a atualização da equipe de patologistas através de exames em laboratórios externos para proficiência, seminários e consultas intra-departamentais visando a obtenção e manutenção da acreditação^{45, 46}.

Tais condutas, ainda pouco seguidas em países em desenvolvimento, vêm se mostrando auxiliares na minimização de discrepâncias laboratoriais⁴⁷.

Adjuvantes ao exame citológico cervical

Diversas tecnologias foram associadas ao rastreamento cervical visando minimização dos falsos negativos onde se destaca a colposcopia, morfometria celular, rastreamento computadorizado, citologia em meio líquido, tipificação viral e outras. Entretanto, todas seguem o mesmo percurso: introdução de nova técnica, aceitação não-crítica do método e desapontamento após seu uso populacional⁴⁸.

Tal fato deve-se à peculiaridade da transformação neoplásica do colo uterino dar-se em várias etapas, onde múltiplos fatores contribuem para o seu desfecho. A identificação será determinada finalmente pela aparência histológica. Marcadores diagnósticos bioquímicos, abordados há aproximadamente duas décadas, ainda encontram-se como adjuvantes experimentais ao diagnóstico histológico cervical^{49, 50}.

A **colposcopia**, exame de magnificação de imagem cervical foi proposta na década de vinte por Hans Hinselmann e se tornou exame indispensável em casos de suspeita de lesão cervical. Permite a visualização, em variados aumentos e sob diferentes filtros de luz, das

estruturas epiteliais do colo e vagina, guiando nas amostragens histológicas de lesões suspeitas (biópsias cervicais)⁵¹.

É considerado exame de referência para investigação de alterações citológicas cervicais, possuindo sensibilidade média de 95% e especificidade média de 45% quando usada na distinção de tecidos cervicais normais de anormais. Já na distinção de L-SIL (Low-grade squamous intraepithelial lesion) com H-SIL (High-grade squamous intraepithelial lesion) e câncer cervical, sua sensibilidade média será de 79% e especificidade de 67%⁵².

Entretanto, é exame que exige profissional treinado, equipamento e soluções especiais além do tempo demandado para adequado diagnóstico cervical⁵³. Torna-se exame impeditivo em nível de atenção primária nos países em desenvolvimento.

Sua principal limitação reside no resultado falso-positivo, onde alteração considerada como “maior” no exame colposcópico, é encontrada na ausência de lesão epitelial ou em lesão de baixo grau⁵⁴. Tal limitação apresentou-se de forma contundente nas publicações dos resultados das estratégias “ver-e-tratar” aplicadas em países do continente Africano, onde o tratamento das lesões cervicais ocorreu sem a confirmação histológica prévia, proporcionada pela biópsia cervical⁵⁵. Taxas de 28% de tratamento excessivo (conização) foram relatadas em casos de colposcopia e citologia alterada, quando o diagnóstico histológico definitivo era lesão de baixo grau da cérvix⁵⁶. Quando o diagnóstico e tratamento cervical deram-se em base colposcópica apenas, inclusive sem o exame citológico cervical prévio, foram relatadas taxas de tratamento excessivo em 60% das vezes⁵⁷.

A relação do **HPV** com lesões precursoras e o câncer da cérvix é a muito conhecida. Desde os trabalhos pioneiros de Shope⁵⁸, que em 1933 estudou a relação entre o papilomavírus e lesões em coelhos, até os dias atuais, que o HPV vem sendo implicado na gênese da maioria das lesões epiteliais do colo uterino.

O HPV pertence à família dos DNA vírus, havendo mais de cento e cinquenta genótipos

descritos com, aproximadamente, quarenta deles infectando o trato ano-genital inferior^{59, 60}. Entre estes, aproximadamente quinze subtipos são considerados como de alto risco para carcinogênese na cérvix uterina, destacando-se os subtipos 16 e 18⁶¹.

De acordo com o comportamento biológico, os diferentes subtipos de HPV poderão ser divididos em alto e baixo-risco oncogênico. O comportamento biológico refere-se à capacidade do HPV em induzir a produção de fatores, pela célula hospedeira, conduzindo a um estado de mitose desregulada e instabilidade genética. Há conseqüente mutação do DNA e precariedade no reconhecimento imunitário celular e humoral destas células mutantes, com sua subseqüente proliferação⁶².

A infecção genital pelo HPV é uma das mais comuns doenças sexualmente transmissíveis com prevalência variando de 20 a 46% das mulheres jovens nos diferentes países, de acordo com o método de detecção empregado⁶³. O diagnóstico da presença do HPV de alto risco oncogênico (HR-HPV) em peças de tumores cervicais escamosos foi relatado em cifras superiores a 90%; já entre os adenocarcinomas em cifras de 75%^{64, 65}. Nas lesões precursoras da cérvix, o encontro do HR-HPV se dará de forma variável, tendendo ao encontro mais freqüente entre NIC 2/3 e em menor número entre NIC 1^{66, 67}.

Por possuir sensibilidade superior à citologia cervical corada pelo método *Papanicolaou*, o diagnóstico da presença do HPV tem sido proposto como teste de rastreamento primário, permanecendo a citologia reservada para aqueles casos com o teste viral positivo. Sua sensibilidade seria de 96% entre as lesões intra-epiteliais de alto grau comparados com a sensibilidade de 53% da citologia convencional. Quanto à especificidade, seria menor que na citologia, ou seja, 90.7% contra os 96.3% do método tradicional⁶⁸.

O diagnóstico da presença do HPV no colo uterino ou vagina poderá ser feito pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Captura Híbrida I e II, *Virapap* e o *Viratype*⁶⁹.

Entretanto, seu diagnóstico possui a limitação do falso-positivo, onde se espera o

encontro de partículas virais em fundo vaginal em 26% das mulheres sem a presença de lesão cervical precursora ou neoplásica^{70, 71}. Atualmente, sua utilização está indicada naqueles casos de atipias de significado indeterminado não excludente de lesão intra-epitelial de alto grau (ASC-H), quando houver dúvida quanto à conduta de imediata colposcopia ou observação do caso por seis meses e repetição da citologia⁷².

Elevado custo, associado a equipamento específico de coleta e armazenagem, relegaram, nos países em desenvolvimento, sua utilização em centros de pesquisa.

A **citologia de meio líquido** foi proposta em 1991 por Hutchinson⁷³. Em 1996 a *Food and Drug Administration*, nos Estados Unidos da América, aprovou para uso comercial o *ThinPrep* e o *Autocyte Prep* como métodos alternativos à citologia cervical convencional.

A proposta era a de melhor preparo das lâminas citológicas utilizando o princípio da centrifugação de células cervicais mantidas em solução de conservação⁷⁴.

Tal técnica permitiria uma monocamada celular epitelial e a ausência de sangue, muco ou grumos celulares na lâmina. A sensibilidade e a especificidade do método parecem aumentar em 7% e 8%, em relação à citologia convencional, respectivamente, quando comparados com o exame padrão-ouro histológico⁷⁵.

Entretanto, como em várias novas tecnologias, a especificidade é precariamente documentada. Acredita-se que o aumento da sensibilidade na citologia de meio líquido seja acompanhada da diminuição da especificidade, seguindo-se um aumento dos custos do sistema de saúde com tratamentos seriados de lesões de baixo grau e com potencial de regressão espontânea^{76, 77}.

Além disto, destaca-se na citologia de meio líquido a perda da morfologia tradicional celular, má qualidade dos grupamentos de células endocervicais e a perda dos elementos diagnósticos advindos do distanciamento entre as células, há muito familiarizados entre os citologistas. A grande justaposição celular e diferenças na fixação dos elementos celulares são

citadas como limitadores do correto diagnóstico⁷⁸.

Marcadores diagnósticos cervicais

Apesar de não possuímos um marcador diagnóstico ideal para o rastreamento de lesões cervicais precursoras ou neoplásicas, este deverá possuir alta sensibilidade, não depender de critérios subjetivos para o seu diagnóstico, ser de custo acessível e aplicável em amostras facilmente coletadas⁷⁹.

Definidos como indicadores bioquímicos da presença de um tumor, os marcadores tumorais poderão ser antígenos de superfície celular, proteínas nucleares ou citoplasmáticas além de enzimas e hormônios⁸⁰.

A tentativa do diagnóstico sangüíneo de tumores cervicais esbarrou no longo período de evolução das lesões precursoras em tecidos intra-epiteliais, local desprovido de vascularização, portanto com deficiente drenagem de elementos diagnósticos passíveis de marcação⁸¹. Além disto, grande parte dos marcadores restringe-se ao encontro de anticorpos específicos produzidos contra oncoproteínas da lesão. Tais anticorpos seriam dependentes do sistema imunitário do paciente, quantidade de estímulo antigênico tumoral e da capacidade de detecção periférica do anticorpo, fatos que retardariam o diagnóstico das lesões^{82, 83}. Tais limitações sugerem o estudo dos marcadores diagnósticos cervicais em amostras coletadas diretamente do órgão, sob visão direta.

A influência do HPV na gênese das lesões neoplásicas cervicais vem sendo apontada por inúmeros estudos epidemiológicos e laboratoriais nas últimas décadas⁸⁴⁻⁸⁷, sendo encontrado virtualmente em todos os casos de câncer cervical, de acordo com a sensibilidade do método de detecção empregado⁸⁸.

A identificação de intermediários produzidos pela incorporação do genoma do HPV nas

células epiteliais cervicais, evitando o simples diagnóstico da presença do DNA viral, torna-se promissor como elemento diagnóstico na cérvix⁸⁹⁻⁹¹.

O processo de carcinogênese da cérvix dá-se em etapas de eventos moleculares, em nível celular epitelial, com a produção de intermediários passíveis de marcação diagnóstica. Não há consenso quanto ao melhor intermediário preditor da carcinogênese na cérvix, onde seu diagnóstico poderá discriminar casos de progressão neoplásica⁹².

Vários intermediários do processo de carcinogênese cervical vem sendo descritos na literatura como úteis para o diagnóstico em peças cervicais^{93, 94}: O PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) e o KI67 mostraram-se como marcadores de proliferação celular; o KI-67 e a ciclina-E que diferenciariam as lesões dos tecidos normais cervicais^{95, 96}; o p53 como marcador de proliferação celular e progressão tumoral⁹⁷; o p16ink^{4a} como marcador de lesão cervical em citologia e histologia, marcador da infecção viral em células cervicais e como auxiliar na redução da variação inter-observador em lesões histológicas cervicais⁹⁸⁻¹¹⁶; além de outros¹¹⁷.

Carcinogênese cervical

No ciclo mitótico celular, a transição das fases de pré-síntese de DNA, síntese, pré-mitose e mitose será controlada por processos de fosforilação protéica atuando sobre um conjunto de pontos de controle. A transição da fase G1 (pré-síntese) para fase S (síntese de DNA) é caracterizada pela ativação (por fosforilação) de proteínas-alvo efetuada pelas CDK^s¹¹⁸. Na **figura 1**, encontra-se a representação de alguns elementos constituintes da transição da fase G1 para a fase S.

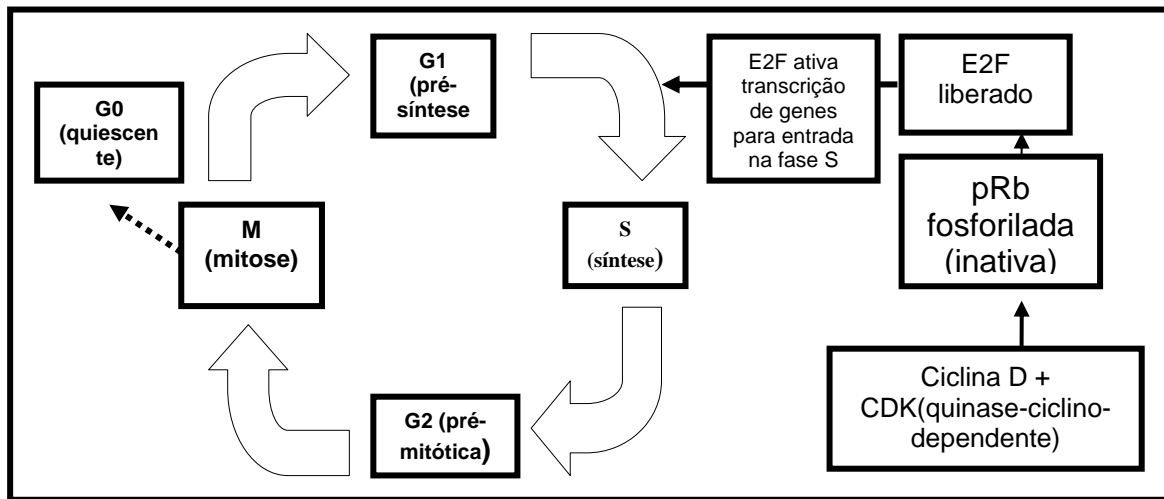


Figura 1 (Ciclo Celular Normal): Fases do ciclo celular normal durante a mitose com ênfase para o ponto de controle G1-S.

Sabe-se que a perda do controle normal do ciclo celular é essencial para que haja transformação neoplásica, ocorrendo mutação em pelo menos um dos quatro reguladores-chave do ciclo celular ($p16^{ink4a}$, ciclina D, CDK^4 e Rb) ¹¹⁹.

A proteína p16 é um dos representantes da expressão do locus 9p21 do gene CDKN2A (cromossoma 9). Esta proteína interage e inibe a quinase ciclino-dependente ou CDK, formando um complexo p16/cdk4 e p16/cdk6. A $p16^{ink4a}$ é a proteína 16 inibidora da CDK^{4a} ¹²⁰. Na **figura 2** encontra-se a representação esquemática do controle do ciclo celular durante a fase de transição G1 – S enfatizando a ação dos produtos do gene CDKN2A.

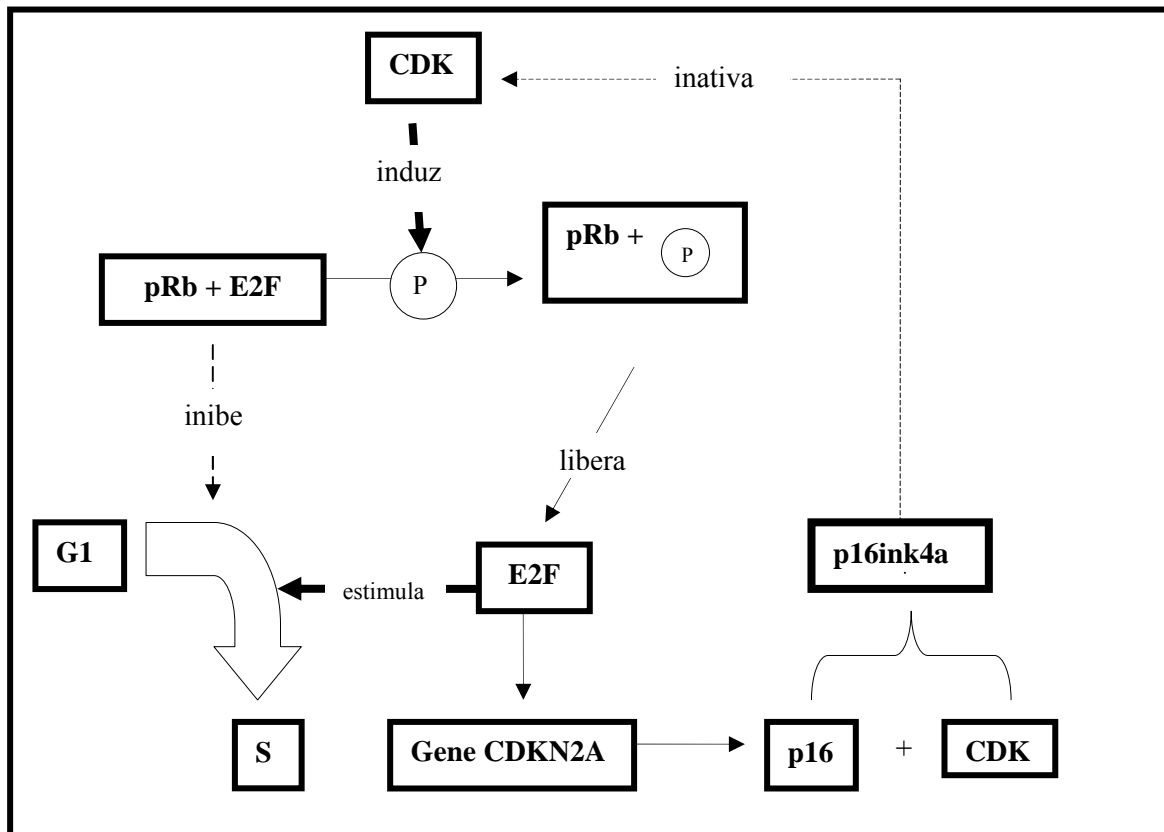


Figura 2 (Ponto de Controle G1-S): Controle do ciclo celular normal na transição da fase G1 para S, com enfoque pra os produtos do gene CDKN2A. Mecanismo de fosforilação dos intermediários representados pelo símbolo \textcircled{P} .

As mutações no gene CDKN2A estão associadas a tumores como os melanomas¹²¹. Já as deleções no mesmo gene estão associadas aos carcinomas pancreáticos, carcinomas esofagianos, pulmão e bexiga, além dos glioblastomas e sarcomas de partes moles^{118, 122, 123}.

Quanto a expressão da fosfoproteína nuclear pRb (proteína do retinoblastoma) que, na forma ativa, atua como “freio” na progressão de células da fase G1 para S no ciclo celular, será também inativada pelas CDK^S, a partir do processo de fosforilação da proteína pRb¹²⁴.

Considerado como um “guardião do genoma” a p53 impede a propagação de células geneticamente danificadas que, contrariamente a pRb, não controla o ciclo celular normal. Será solicitada como freio de emergência quando ocorrer alteração do ácido desoxirribonucléico (DNA), levando à parada do ciclo celular e morte celular programada (apoptose), impedindo a

propagação de células geneticamente danificadas. Este mecanismo de controle da adequada replicação do DNA, também ocorrerá na fase tardia de G1 e será dependente das cdk^s ¹¹⁸.

Pelo exposto, em casos de cânceres cervicais, o esperado seria a ausência do complexo p16ink^{4a}, justificando a proliferação celular a partir da ativação das cdk^s fosforiladas no ciclo celular. Entretanto, curiosamente na avaliação de linhagens celulares derivadas de tumores cervicais, há a presença da p16ink^{4a} e, em alguns casos, sua hiperexpressão ¹²⁵⁻¹²⁷.

Ocorre que, diferentemente das demais localizações, a carcinogênese cervical está intimamente relacionada à infecção por cepas do HPV, notadamente o de alto risco oncogênico. Este grupo viral possui a capacidade de integração do genoma viral ao genoma da célula epitelial cervical ou queratinócito ¹²⁸⁻¹³⁰, com a consequente produção das oncoproteínas E6 e E7 pela célula hospedeira.

A oncoproteína E6 possui a capacidade de degradação da p53; já a oncoproteína E7, inativa (por fosforilação) a pRb ^{131, 132}. Há uma reciprocidade entre a inativação da pRb pela oncoproteína E7 do HR-HPV e liberação do controle da fase G1-S do ciclo celular com a perda do *feed-back* negativo entre a pRb e o gene CDKN2A seguindo-se da produção e acúmulo do p16ink^{4a} em núcleo e citoplasma ^{133, 134}. Na **Figura 3**, encontra-se a representação gráfica da ação do HR-HPV no ciclo celular.

A p53, que normalmente inicia mecanismo bioquímico de parada do ciclo celular e apoptose em casos de mutação do DNA no queratinócito, agora degradada pela proteína E6 do HPV contribui para imortalização celular e consequente origem da neoplasia ¹³⁵.

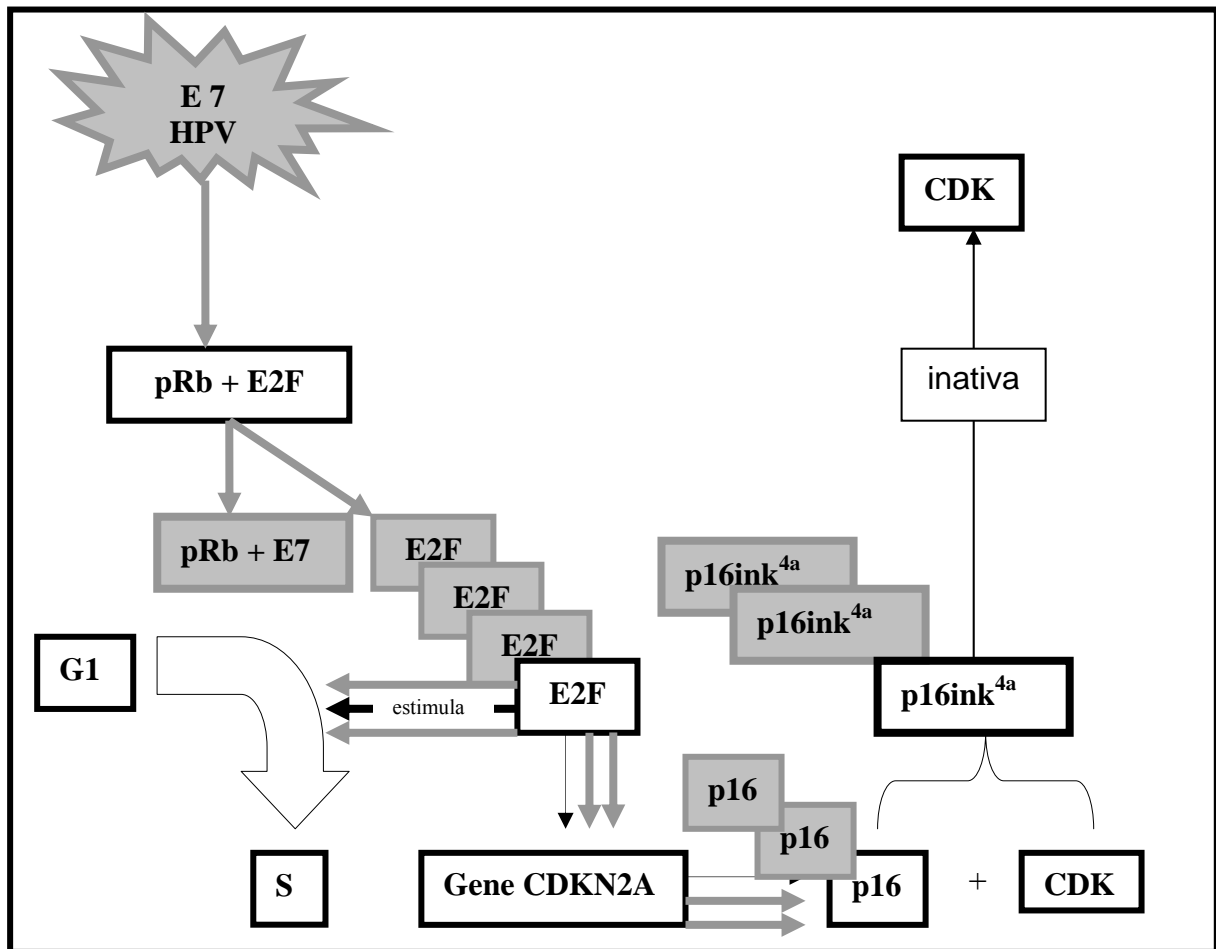


Figura 3 (Ciclo celular sob ação da proteína E7 do papilomavírus humano): Ciclo celular sob ação da proteína E7 do papilomavírus humano de alto risco oncogênico. Intermediários da ação do HR-HPV destacados na cor cinza.

Proteína 16 inibidora da CDK 4A (P16ink^{4A})

Em 1994, durante estudo que visava o diagnóstico de mutações ou deleções no gene CDKN2A e na expressão do pRb, concluiu-se que havia relação inversa entre as expressões dos produtos protéicos do gene naqueles tecidos tumorais com pRb inativo¹³⁶.

Seguiu-se estudo em 1998 que verificou a presença da proteína p16 entre noventa e oito peças histológicas de NIC 1, NIC 2/3 e carcinoma cervical (CA), verificando positividade difusa entre trinta e oito de trinta e nove casos de câncer e todos os casos de NIC 2/3¹³⁷.

Em 2001, Klaes e cols., estudaram cento e noventa e nove peças de histologia cervical com diagnóstico de lesão precursora ou neoplásica e cento e onze peças sem lesão. Encontraram expressão difusa positiva para o anticorpo anti-p16ink^{4a} em todos os casos de NIC 2/3 (noventa e duas peças) e entre cinquenta e oito de sessenta casos de CA¹³⁸. No mesmo ano, Keating e colaboradores, avaliando 99 peças de biópsia arquivadas, utilizou o anti-p16ink^{4a} como marcador de lesões cervicais associadas com o HR-HPV onde a expressão difusa ou focal do anticorpo associou-se fortemente com a presença do vírus em 85.5% dos casos¹³⁹.

Durante o ano de 2002, Bibbo e cols. avaliaram a presença do anti-p16ink^{4a} em quarenta e sete citologias de meio líquido arquivadas e encontraram expressão para o anticorpo entre 96% dos casos de H-SIL e 74% dos L-SIL¹⁴⁰. Também em 2002, Klaes e cols. compararam a concordância entre cinco patologistas no diagnóstico de cento e noventa e quatro biópsias cervicais coradas com hematoxilina/eosina (HE) e após com o anticorpo anti-p16ink^{4a}. Concluíram que o índice kappa para concordância inicial de 0,60 para HE tornou-se 0,91 na leitura com o anticorpo anti-p16ink^{4a}¹⁴¹.

No mesmo ano, o estudo de Saqi e cols. sugeriu que há estrita relação entre HPV e anti-p16ink^{4a} entre citologias de meio líquido e que o uso do anticorpo monoclonal serve como marcador para a "detecção citopática" da presença viral. Sugere que em laboratórios de boa qualidade o uso do anti-p16ink^{4a} poderá substituir a captura híbrida em citologias cervicais de meio líquido¹⁴².

Pientong e cols., durante o ano de 2003, estudaram citologias cervicais coletadas apenas com espátulas de Ayre (sem o uso da escova *cytobrush*), com o anti-p16ink^{4a} que foram

distribuídas em cinco grupos de trinta lâminas: normais, ASC-US, L-SIL, H-SIL e CA. Concluíram que há positividade para anti-p16ink^{4a} entre 97% dos CA, 93% dos H-SIL, 33% dos L-SIL, 57% das atipias de significado indeterminado (ASC) e ausência de positividade para anti-p16ink^{4a} entre todas as lâminas de citologia cervical normais¹⁴³.

Bibbo e cols., tentando encontrar diferenças entre ASC-H e as H-SIL, utilizaram o anticorpo anti-p16ink^{4a} em trinta lâminas de citologia cervical coletadas de meio líquido e encontraram positividade para o anticorpo entre dezessete de dezoito casos de H-SIL, concluindo que a expressão do anti-p16ink^{4a} mostra-se como promissor substituto no diagnóstico em casos duvidosos de ASC-H¹⁴⁴.

Murphy e cols, examinaram o potencial do anticorpo anti-p16ink^{4a} entre cento e trinta e dois casos com lesão precursora ou neoplásica e vinte e um casos sem lesão cervical, amostradas pelo método da citologia de meio líquido. Em todos os dez casos de câncer cervical, houve forte expressão ao anticorpo; 83,5% de positividade moderada ou forte entre as H-SIL e 92% entre as L-SIL¹⁴⁵.

Já no estudo de Agoff e cols, examinaram-se seiscentas e quarenta e cinco peças de histologia cervical com o objetivo de comparar o grau de expressão do anticorpo anti-p16ink^{4a} e o diagnóstico da lesão, além de relacionar os achados com a presença do HPV. Positividade para o anti-p16ink^{4a} correlacionou-se significativamente para a presença de HR-HPV, avaliado pela captura híbrida ou pela PCR. Entre casos de câncer cervical, houve 89% de positividade para o anticorpo. Quanto às lesões precursoras da cérvix que foram positivas para anti-p16ink^{4a}, havia positividade para o HR-HPV em 84% das vezes. Entretanto o encontro do vírus de alto risco oncogênico, por captura híbrida, ocorreu entre 36% de casos negativos para lesão e em 47% dos casos quando utilizado o PCR¹⁴⁶.

Em 2004, Negri e cols¹⁴⁷ realizaram estudo entre cento e vinte sete peças arquivadas de histologia cervical. Visava a utilização do anti-p16ink^{4a} como “marcador de tendência” para

evolução de lesões precursoras iniciais do colo uterino. Os autores utilizaram peças com diagnóstico de NIC 1 que foram divididas em dois grupos: No primeiro, lesões que evoluíram para regressão espontânea; no segundo, que evoluíram para NIC 2/3. A conclusão foi que, em 71% dos casos de anti-p16ink^{4a} negativos iniciais, houve regressão espontânea da doença. Já entre 62% dos casos positivos, houve evolução para NIC 2/3. Os autores citam que o anticorpo monoclonal pode ser um marcador de atividade oncogênica do HPV no colo uterino e que critérios cito-morfológicos isolados não distinguem lesões precursoras iniciais que irão progredir.

Em 2004, Wang ¹⁴⁸ e colaboradores avaliaram o anticorpo monoclonal entre quarenta biópsias cervicais originadas de dezessete mulheres acompanhadas de 1982 a 2000. Concluíram que o anti-p16ink^{4a} é um indicador da progressão da doença cervical e, quando positividade para o anticorpo, há redução no tempo para a evolução da doença. O tempo médio de progressão entre os casos negativos para o anticorpo foi de cento e vinte e dois meses contra os sessenta e quatro meses entre os casos positivos.

Em 2004 Kanao e cols¹⁴⁹ utilizaram vinte e cinco peças de CA estadiados entre T1B e T3B e onze peças normais de colo. Visava diagnosticar a presença concomitante de positividade para o anti-p16ink^{4a} e a infecção pelo HPV. Concluíram que a positividade para o anticorpo foi significativamente maior entre os casos de neoplasia invasora infectadas pelo HPV 16, 18, 58, 33 e 31 (n=21 ou 84%). Sugere que a hiper-metilação do gene CDKN2A poderia explicar os quatro casos de negatividade para o HPV que apresentaram neoplasia cervical.

Em 2004, Trunk e cols.¹⁵⁰ publicaram extensa revisão sobre a utilização do anticorpo anti-p16ink^{4a} como um “localizador” de células discarióticas durante o exame citológico de baixa magnificação (leitura microscópica inicial em pequeno aumento). A positividade para o anticorpo entre células basais ou pára-basais no esfregaço poderá ser considerado como um

sinal específico da ativação do oncogene viral. Citam que a “varredura” da lâmina de citologia em pequeno aumento destaca o contingente celular que deverá merecer atenção para as alterações nucleares e citoplasmáticas, evitando o fenômeno da habituação. Entre estas células marcadas, foram aplicados os critérios morfológicos tradicionais.

Em 2005 Murphy e cols.¹⁵¹, estudando cento e setenta e seis blocos de parafina obtidos de pacientes com e sem lesão cervical, encontraram positividade para o anticorpo anti-p16ink^{4a} na histologia de todos os CA e em 98% dos NIC 2/3. Concluiu que o anticorpo é valioso quanto à sensibilidade no diagnóstico de lesões precursoras ou neoplásicas cervicais.

Em 2005, Wentzensen e cols.¹⁵², utilizaram o anticorpo em citologia de meio líquido com o objetivo aplicar um “escore nuclear” indicativo de gravidade de lesão cervical precursora. Concluíram que, após a localização da célula a partir da positividade ao anticorpo, a aplicação do escore nuclear facilitará o diagnóstico dos H-SIL.

Em nosso meio, no ano de 2005, duas publicações foram realizadas utilizando o anticorpo anti-p16ink^{4a}. No Estado de São Paulo, Longatto-filho e cols.¹⁵³, usaram o anticorpo monoclonal e o diagnóstico do HPV, entre cento e noventa e nove citologias de meio líquido, consideradas como normais ou com diagnóstico de ASC-US. Os casos foram acompanhados semestralmente por três anos. Os autores concluíram que casos positivos para o anticorpo monoclonal e HR-HPV deverão ser cuidadosamente observados para exclusão de lesão precursora. No Estado do Rio Grande do Sul, Lambert e cols.¹⁵⁴, avaliaram a expressão do anticorpo entre cinquenta e quatro peças de histologia arquivadas, sendo vinte e sete lesões precursoras e igual número de carcinomas invasores. Concluíram que há associação significativa entre gravidade da lesão histológica e positividade para o anticorpo.

Justificativa

A baixa sensibilidade do exame citológico convencional (*Papanicolaou*) para o rastreamento das lesões cervicais, associado à carência de recursos humanos e materiais para utilização de outros métodos (biologia molecular para HPV, citologia em meio líquido ou colposcopia), apontam para a necessidade de alternativas diagnósticas. Novos métodos deverão concatenar baixo custo, fácil aplicação e alta sensibilidade para o diagnóstico das lesões cervicais precursoras ou neoplásicas.

Dentre as várias alternativas diagnósticas em cérvix, o anticorpo anti-p16ink^{4a} se mostra promissor no aprimoramento da sensibilidade na citologia cervical. Entretanto há carência de estudos utilizando o anticorpo em citologias coletadas da forma convencional, associadas ao exame padrão-ouro cervical (biópsia dirigida por colposcopia e corada com hematoxilina-eosina).

Objetivo Geral

Avaliar a expressão do anticorpo anti-p16ink^{4a} em citologia cervical convencional.

Objetivo Específico

Avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (vp+) e negativo (vp-) do anticorpo anti-p16ink^{4a} em citologia cervical para o diagnóstico de lesões precursoras ou

neoplásicas do colo uterino.

Avaliar a variação inter-observador na leitura das lâminas de citologia coradas com o anticorpo anti-p16ink^{4a}.

Avaliar a factibilidade do uso do anticorpo anti-p16ink^{4a} em citologia cervical (tempo demandado para preparação da lâmina e difusão do anticorpo no esfregaço, qualidade das células diagnósticas e custo do procedimento).

Bibliografia:

1. Sawaya GF. Papanicolaou testing: when does more become less? *Am J Med* 2005; 118(2):159-160.
2. Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121(3):211-224.
3. Felix JC, Amezcua C. In vitro adjuncts to the pap smear. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):685-99, vii.
4. Gaffikin L, Lauterbach M, Blumenthal PD. Performance of visual inspection with acetic acid for cervical cancer screening: a qualitative summary of evidence to date. *Obstet Gynecol Surv* 2003; 58(8):543-550.
5. Screening for cervical cancer. The U.S. Preventive Services Task Force. *Am Fam Physician* 1990; 41(3):853-857.
6. Felix JC, Amezcua C. In vitro adjuncts to the pap smear. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):685-99, vii.
7. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *JAMA* 1989; 261(5):737-743.
8. Felix JC, Amezcua C. In vitro adjuncts to the pap smear. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):685-99, vii.
9. Pientong C, Ekalaksananan T, Swadpanich U et al. Immunocytochemical detection of p16INK4a protein in scraped cervical cells. *Acta Cytol* 2003; 47(4):616-623.
10. Nanda K, McCrory DC, Myers ER et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review
17. *Ann Intern Med* 2000; 132(10):810-819.
11. Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde do Brasil. Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo Uterino. INCA . 24-7-0002.
Ref Type: Electronic Citation
12. Ministério da Saúde do Brasil. Campanha de Prevenção do Câncer de Colo do Útero no Brasil. 2002.
Ref Type: Internet Communication
13. Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Mortalidade por Município e CRS de Residência SIM/RS 1997-2003. 2004.
Ref Type: Internet Communication
14. Secretaria da Saúde do Município de Porto Alegre. Prevenção ao Câncer Ginecológico - Secretaria da Saúde do Município de Porto Alegre (Políticas em Saúde / Saúde da Mulher). 2004.
Ref Type: Internet Communication

15. Cardenas-Turanzas M, Follen M, Benedet JL, Cantor SB. See-and-treat strategy for diagnosis and management of cervical squamous intraepithelial lesions. *Lancet Oncol* 2005; 6(1):43-50.
16. Instituto Nacional do Cancer (INCA). Estimativa 2006 - Incidência de Cancer no Brasil. 2006.
Ref Type: Internet Communication
17. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *JAMA* 1989; 261(5):737-743.
18. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338(7):423-428.
19. Lonky NM. Risk factors related to the development and mortality from invasive cervical cancer clinical utility and impact on prevention. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):817-42, viii.
20. Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffman D, Wynder E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers
1. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158(4):910-913.
21. Haverkos HW, Soon G, Steckley SL, Pickworth W. Cigarette smoking and cervical cancer: Part I: a meta-analysis. *Biomed Pharmacother* 2003; 57(2):67-77.
22. Phillips DH, She MN. DNA adducts in cervical tissue of smokers and non-smokers
2. *Mutat Res* 1994; 313(2-3):277-284.
23. Lonky NM. Risk factors related to the development and mortality from invasive cervical cancer clinical utility and impact on prevention. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):817-42, viii.
24. Intyre-Seltman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology
1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(5):1165-1170.
25. Halpert R, Fruchter RG, Sedlis A, Butt K, Boyce JG, Sillman FH. Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 1986; 68(2):251-258.
26. Mandelblatt JS, Kanetsky P, Eggert L, Gold K. Is HIV infection a cofactor for cervical squamous cell neoplasia? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8(1):97-106.
27. Lonky NM. Risk factors related to the development and mortality from invasive cervical cancer clinical utility and impact on prevention. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):817-42, viii.
28. Marchand L, Mundt M, Klein G, Agarwal SC. Optimal collection technique and devices for a quality pap smear. *WMJ* 2005; 104(6):51-55.

29. Felix JC, Amezcua C. In vitro adjuncts to the pap smear. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):685-99, vii.
30. Felix JC, Lonky NM, Tamura K et al. Aberrant expression of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia correlates with a false-negative Papanicolaou smear
1. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186(6):1308-1314.
31. La VC, Franceschi S, Decarli A, Fasoli M, Gentile A, Tognoni G. Pap smear and the risk of cervical neoplasia: quantitative estimates from a case-control study
1. *Lancet* 1984; 2(8406):779-782.
32. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2001; 8(2):83-92.
33. Renshaw AA, Prey MU, Hodes L, Weisson M, Haja J, Moriarty AT. Cytologic features of high-grade squamous intraepithelial lesion in conventional slides: what is the difference between cases that perform well and those that perform poorly? *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129(6):733-735.
34. Smith PA, Turnbull LS. Small cell and 'pale' dyskaryosis. *Cytopathology* 1997; 8(1):3-8.
35. Baker RW, O'Sullivan JP, Hanley J, Coleman DV. The characteristics of false negative cervical smears--implications for the UK cervical cancer screening programme. *J Clin Pathol* 1999; 52(5):358-362.
36. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2001; 8(2):83-92.
37. Schneider V, Henry MR, Jimenez-Ayala M, Turnbull LS, Wright TC. Cervical cancer screening, screening errors and reporting. *Acta Cytol* 2001; 45(4):493-498.
38. Bergeron C, Debaque H, Ayivi J, Amaizo S, Fagnani F. Cervical smear histories of 585 women with biopsy-proven carcinoma in situ. *Acta Cytol* 1997; 41(6):1676-1680.
39. Sato S, Mikino H, Matsunaga G, Yajima A. False negative rate in mass screening for cervical cancer. *Acta Cytol* 1998; 42(3):836-837.
40. Cohn DE, Herzog TJ. New innovations in cervical cancer screening. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44(3):538-549.
41. Bergeron C, Debaque H, Ayivi J, Amaizo S, Fagnani F. Cervical smear histories of 585 women with biopsy-proven carcinoma in situ. *Acta Cytol* 1997; 41(6):1676-1680.
42. Schneider V, Henry MR, Jimenez-Ayala M, Turnbull LS, Wright TC. Cervical cancer screening, screening errors and reporting. *Acta Cytol* 2001; 45(4):493-498.
43. Mody DR, Davey DD, Kline TS. Workload limits and CLIA 88 in the 1990's: how much is too much? Or too little?
38. *Diagn Cytopathol* 1997; 16(1):vii-viii.

44. Ehrmeyer SS, Laessig RH. Has compliance with CLIA requirements really improved quality in US clinical laboratories?
6. Clin Chim Acta 2004; 346(1):37-43.
45. Ehrmeyer SS, Laessig RH. Has compliance with CLIA requirements really improved quality in US clinical laboratories?
6. Clin Chim Acta 2004; 346(1):37-43.
46. Tan KB, Chang SA, Soh VC, Thamboo TP, Nilsson B, Chan NH. Quality indices in a cervicovaginal cytology service: before and after laboratory accreditation. Arch Pathol Lab Med 2004; 128(3):303-307.
47. Mody DR, Davey DD, Kline TS. Workload limits and CLIA 88 in the 1990's: how much is too much? Or too little?
38. Diagn Cytopathol 1997; 16(1):vii-viii.
48. Giard RW. False-negative rate of cervical cytology: sense and sensitivity. Diagn Cytopathol 2001; 25(5):275-277.
49. Giard RW. False-negative rate of cervical cytology: sense and sensitivity. Diagn Cytopathol 2001; 25(5):275-277.
50. Cohn DE, Herzog TJ. New innovations in cervical cancer screening. Clin Obstet Gynecol 2001; 44(3):538-549.
51. Dexeus S, Cararach M, Dexeus D. The role of colposcopy in modern gynecology. Eur J Gynaecol Oncol 2002; 23(4):269-277.
52. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. Obstet Gynecol 1998; 91(4):626-631.
53. Cronje HS. Screening for cervical cancer in developing countries. Int J Gynaecol Obstet 2004; 84(2):101-108.
54. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. Obstet Gynecol 1998; 91(4):626-631.
55. Cardenas-Turanzas M, Follen M, Benedet JL, Cantor SB. See-and-treat strategy for diagnosis and management of cervical squamous intraepithelial lesions. Lancet Oncol 2005; 6(1):43-50.
56. Bigrigg MA, Codling BW, Pearson P, Read MD, Swinger GR. Colposcopic diagnosis and treatment of cervical dysplasia at a single clinic visit. Experience of low-voltage diathermy loop in 1000 patients
2. Lancet 1990; 336(8709):229-231.
57. Kattukaran A, Kekre A, Jose R, Seshadri L. See & treat protocol for evaluation & management of cervical intraepithelial neoplasia
1. Indian J Med Res 2002; 116:106-110.

58. Shope R. Infections papillomatosis of rabbits. *J Exp Med* 1933; 58:609.
59. Schiffman MH, Castle P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(6):E2.
60. Munoz N, Bosch FX, de SS et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(6):518-527.
61. Lehtinen M, Pawlita M, Zumbach K et al. Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(1):49-55.
62. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(2):187-193.
63. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338(7):423-428.
64. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide
5. *J Pathol* 1999; 189(1):12-19.
65. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88(1):63-73.
66. Arbyn M, Buntinx F, Van RM, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4):280-293.
67. Yoshida T, Fukuda T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials. *Cancer* 2004; 102(2):100-108.
68. Cuzick J, Clavel C, Petry KU et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006; 119(5):1095-1101.
69. Lehtinen M, Pawlita M, Zumbach K et al. Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(1):49-55.
70. Klaes R, Benner A, Friedrich T et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(11):1389-1399.

71. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338(7):423-428.
72. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; 287(16):2120-2129.
73. Hutchinson ML, Cassin CM, Ball HG, III. The efficacy of an automated preparation device for cervical cytology
1. *Am J Clin Pathol* 1991; 96(3):300-305.
74. Hartmann KE, Nanda K, Hall S, Myers E. Technologic advances for evaluation of cervical cytology: is newer better? *Obstet Gynecol Surv* 2001; 56(12):765-774.
75. Abulafia O, Pezzullo JC, Sherer DM. Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. *Gynecol Oncol* 2003; 90(1):137-144.
76. Myers ER, McCrory DC, Subramanian S et al. Setting the target for a better cervical screening test: characteristics of a cost-effective test for cervical neoplasia screening 4. *Obstet Gynecol* 2000; 96(5 Pt 1):645-652.
77. Hartmann KE, Nanda K, Hall S, Myers E. Technologic advances for evaluation of cervical cytology: is newer better? *Obstet Gynecol Surv* 2001; 56(12):765-774.
78. Herbert A, Johnson J. Personal view. Is it reality or an illusion that liquid-based cytology is better than conventional cervical smears? *Cytopathology* 2001; 12(6):383-389.
79. Ienbach-Hellweg G, Trunk MJ, von Knebel DM. Traditional and new molecular methods for early detection of cervical cancer. *Arkh Patol* 2004; 66(5):35-39.
80. Pamies RJ, Crawford DR. Tumor markers. An update
1. *Med Clin North Am* 1996; 80(1):185-199.
81. Lehtinen M, Pawlita M, Zumbach K et al. Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(1):49-55.
82. Heim K, Widschwendter A, Pirschner G et al. Antibodies to human papillomavirus 16 L1 virus-like particles as an independent prognostic marker in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186(4):705-711.
83. Lehtinen M, Pawlita M, Zumbach K et al. Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(1):49-55.
84. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide
5. *J Pathol* 1999; 189(1):12-19.

85. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19(1-2):1-5.
86. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(8):930-934.
87. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(4):244-265.
88. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(8):930-934.
89. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2001; 8(2):83-92.
90. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7):884-891.
91. Stanley MA. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. *Virus Res* 2002; 89(2):241-248.
92. Lin WM, Ashfaq R, Michalopoulos EA, Maitra A, Gazdar AF, Muller CY. Molecular Papanicolaou tests in the twenty-first century: molecular analyses with fluid-based Papanicolaou technology
1. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(1):39-45.
93. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2001; 8(2):83-92.
94. Lonky NM. Risk factors related to the development and mortality from invasive cervical cancer clinical utility and impact on prevention. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):817-42, viii.
95. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2001; 8(2):83-92.
96. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7):884-891.
97. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7):2407-2414.
98. Murphy N, Ring M, Heffron CC et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58(5):525-534.
99. Tringler B, Gup CJ, Singh M et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2004; 35(6):689-696.

100. Wang JL, Zheng BY, Li XD et al. p16INK4A and p14ARF expression pattern by immunohistochemistry in human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Mod Pathol* 2005; 18(5):629-637.
101. Negri G, Vittadello F, Romano F et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004; 445(6):616-620.
102. Murphy N, Heffron CC, King B et al. p16INK4A positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. *Virchows Arch* 2004; 445(6):610-615.
103. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Fu E. Expression of p16INK4A in Pap smears containing atypical glandular cells from the uterine cervix. *Acta Cytol* 2004; 48(2):173-180.
104. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7):2407-2414.
105. Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L et al. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. *J Pathol* 2003; 201(4):535-543.
106. Ishikawa M, Fujii T, Masumoto N et al. Correlation of p16INK4A overexpression with human papillomavirus infection in cervical adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(4):378-385.
107. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(2):187-193.
108. Murphy N, Ring M, Killalea AG et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003; 56(1):56-63.
109. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16(7):665-673.
110. Klaes R, Benner A, Friedrich T et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(11):1389-1399.
111. Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P. Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (SurePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002; 27(6):365-370.

112. Bibbo M, DeCecco J, Kovatich AJ. p16INK4A as an adjunct test in liquid-based cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 2003; 25(1):8-11.
113. Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B et al. Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol* 2004; 31(4):235-242.
114. Ichinose H. p16INK4a IHC in the diagnosis of cervical CIN. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(9):1284.
115. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92(2):276-284.
116. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7):884-891.
117. Lonky NM. Risk factors related to the development and mortality from invasive cervical cancer clinical utility and impact on prevention. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):817-42, viii.
118. Cotran RS KVCT. Neoplasia. In: Guanabara Koogan, editor. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: 2000 p. 233-295.
119. Hunter T. Oncoprotein networks
10. *Cell* 1997; 88(3):333-346.
120. Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol* 2004; 5(1):27-36.
121. Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol* 2004; 5(1):27-36.
122. Aagaard L, Lukas J, Bartkova J, Kjerulff AA, Strauss M, Bartek J. Aberrations of p16Ink4 and retinoblastoma tumour-suppressor genes occur in distinct sub-sets of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 1995; 61(1):115-120.
123. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int* 1998; 48(8):580-585.
124. Tringler B, Gup CJ, Singh M et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2004; 35(6):689-696.
125. Aagaard L, Lukas J, Bartkova J, Kjerulff AA, Strauss M, Bartek J. Aberrations of p16Ink4 and retinoblastoma tumour-suppressor genes occur in distinct sub-sets of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 1995; 61(1):115-120.
126. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int* 1998; 48(8):580-585.

127. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92(2):276-284.
128. Tringler B, Gup CJ, Singh M et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2004; 35(6):689-696.
129. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92(2):276-284.
130. Kanao H, Enomoto T, Ueda Y et al. Correlation between p14(ARF)/p16(INK4A) expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Lett* 2004; 213(1):31-37.
131. Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L et al. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. *J Pathol* 2003; 201(4):535-543.
132. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7):884-891.
133. Murphy N, Ring M, Killalea AG et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003; 56(1):56-63.
134. Yoshida T, Fukuda T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials. *Cancer* 2004; 102(2):100-108.
135. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7):2407-2414.
136. Aagaard L, Lukas J, Bartkova J, Kjerulff AA, Strauss M, Bartek J. Aberrations of p16Ink4 and retinoblastoma tumour-suppressor genes occur in distinct sub-sets of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 1995; 61(1):115-120.
137. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int* 1998; 48(8):580-585.
138. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92(2):276-284.

139. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7):884-891.
140. Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 2002; 46(1):25-29.
141. Klaes R, Benner A, Friedrich T et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(11):1389-1399.
142. Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P. Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (SurePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002; 27(6):365-370.
143. Pientong C, Ekalaksananan T, Swadpanich U et al. Immunocytochemical detection of p16INK4a protein in scraped cervical cells. *Acta Cytol* 2003; 47(4):616-623.
144. Bibbo M, DeCecco J, Kovatich AJ. p16INK4A as an adjunct test in liquid-based cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 2003; 25(1):8-11.
145. Murphy N, Ring M, Killalea AG et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003; 56(1):56-63.
146. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16(7):665-673.
147. Negri G, Vittadello F, Romano F et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004; 445(6):616-620.
148. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7):2407-2414.
149. Kanao H, Enomoto T, Ueda Y et al. Correlation between p14(ARF)/p16(INK4A) expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Lett* 2004; 213(1):31-37.
150. Trunk MJ, Ikenbach-Hellweg G, Ridder R et al. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol* 2004; 48(6):771-782.
151. Murphy N, Ring M, Heffron CC et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58(5):525-534.

152. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S, von Knebel DM. Evaluation of a nuclear score for p16INK4a-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer* 2005; 105(6):461-467.
153. Longatto FA, Utagawa ML, Shirata NK et al. Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24(2):118-124.
154. Lambert AP, Anschau F, Schmitt VM. p16INK4A expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp Mol Pathol* 2006; 80(2):192-196.

Artigo em Inglês

Antibody anti-p16ink^{4a} in cervical cytology⁽¹⁾

Alexandre da Silva Rocha ⁽²⁾, Mary Clarisse Bozzetti ⁽³⁾, Luciana Schmidt Kirschnick ⁽²⁾, Maria Isabel Albano Edelweiss⁽³⁾

Postgraduate Course in Medicine and Medical Sciences School
of Medicine
Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

- (1) Pathology Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- (2) Postgraduate Course in Medical Sciences
- (3) Professor of the Postgraduate Course in Medical Sciences

Correspondence to:

Alexandre Rocha
dralexandrerocha@terra.com.br
Frei Germano street 200/503B
São José / Porto Alegre / RS
91530-060
Brazil

Abstract

Introduction: The use of the antibody anti-p16ink^{4a} to increase the sensitivity of the cytological examination, has presented promising results. However, there is a lack of studies which use the monoclonal antibody in cervical cytology linked to the histological examination of the uterine cervix. **Objectives:** To evaluate sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the anti-p16ink^{4a} in conventional collected cervical cytology. **Method:** A case-control study was carried out in a cervical pathology reference center. The cytology slides, submitted to the immunocytochemistry for the diagnostic antibody, were conventionally collected with spatula of *Ayre* and *Cytobrush*. The slides were interpreted by two independent pathologists (P1 and P2). Cases (n=61) represented all cervical investigations that had resulted in compatible diagnostic biopsy with CIN 1, 2 or 3 or squamous carcinoma. Controls (n=87), included all investigations presenting *Papanicolaou* cytology and colposcopy negative. **Results:** Sensitivity for the histological diagnosis of CIN 2, 3 (n=23) was 100% and 95.7% for P1 and P2, respectively. The negative predictive value on the CIN 2, 3 was 100% (P1) and 98.6% (P2). In two cases of squamous carcinoma, sensitivity was 100%, for both pathologists. Sensitivity for the diagnosis of CIN 1 was 77.8% (P1) and 58.3% (P2). The negative predictive value for CIN 1 was 90.6% (P1) and 83% (P2). The kappa index between the two pathologists was 0.74. Among the cases of CIN 2, 3 associating the nuclear positivity to the antibody, the percent difference between pathologists was inferior to 5%. Exactly the same scores were found among cases of absence of cervical lesion and negativity for the antibody. On the other hand in CIN 1 patients there was a greater inter-observer variation. **Conclusions:** Our results suggest that the antibody anti-p16ink^{4a} could contribute as an adjuvant tool in the follow up of intra-epithelial lesions in conventional collected cervical cytology.

Introduction

Ever since the cervical cytology exam was brought up as a tool for populational screening program there has been a decrease on cervical cancer mortality and morbidity rate¹. However, an accurate sensitivity on the diagnosis of cervical alterations by this exam has been disappointing, with a mean sensitivity of 0.51 (95%CI 0.37-0.66), showing better results among high grade cervical lesions²⁻⁴.

Half the cases of cervical cancer in countries with screening program coverage above 85% occur in women who were not tested over the last five years and, among the ones tested, 12 to 23% did not present regular follow up⁵.

Approximately 60% of the flaws on the cervical cytological exam are due to inappropriate sample collection, the remaining 40% are due to laboratory errors⁶⁻⁸. Among those diagnosed with cervical cancer, a review of their “normal” cytological exams happening within the last three years is expected to be done as well as a reclassification for high grade intra-epithelial lesion (H-SIL) 40% of the time⁶.

Although it is not known as an accurate marker for cervical lesions, its characteristics should be to provide high sensitivity, not to depend upon subjective criteria for the diagnosis, to be reasonable and affordable, and specially, to be presented on easily collectable samples⁹.

The influence of the human papillomavirus (HPV) on the genesis of the precursors or neoplastic lesions of the cervix is now well established in various studies over the last decades¹⁰⁻¹³. Indeed, HPV infection has been detected in almost all cervical cancer cases according to the sensitivity of the method used for detection¹². The identification of products produced by the incorporation of the HPV genome on the epithelial cervical cells, which avoid a simple diagnosis of the presence of a viral DNA, becomes a promising feature as an element of cervix diagnosis¹⁴⁻¹⁶.

The use of antibodies improves the reading performance of the staining from a cell even with a slight increase on the microscopic exam. The squamous markers PCNA, ki-67 (MIB1), cyclin-E e o anti-p16ink^{4a}; or glandular markers MN, cd44, ki-67 and the anti-p16ink^{4a}, figure like a potential diagnostic candidate in cervix uteri¹⁴⁻¹⁷. The proposal to make use of diagnostic markers was because of the highlight of abnormal cells during the microscope low magnification and the reduction on the reading errors¹⁷.

The carcinogenesis process happens in stages of molecular events at an epithelial cell level with the production of intermediaries which are sensible to markers. There hasn't been a consensus regarding the best predictive intermediary of cervix carcinogenesis and whether its diagnosis will prevent neoplastic progression¹⁸.

The PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and ki-67 has proven to be a cell proliferation antibody; ki-67 and cyclin-E have separated normal cervical tissues from lesions¹⁴⁻¹⁵; p53 was a cell proliferation and a progression antibody¹⁹; anti-p16ink^{4a} is an antibody of precursory cervical lesion in cytological and histological exam, an infection marker through HPV in cervical cells, and an assistant on the reduction of inter-observer variations on cervical histological lesions^{15,19,36}.

Among the various alternatives for cervical lesions diagnosis, the anti-p16ink^{4a} has proven to be a promising aid on the improvement of cervical cytological sensitivity. However there is a need for further studies on the use of antibody in conventional collected cytology (non liquid-based cytology) linked to the standard cervical exam (directed biopsy staining with hematoxilin-eosin).

The antibody anti-p16ink^{4a} is suggested to work as a cytopathic detector of the presence of HPV together with the cervical cell genome inducing to an imbalanced mitosis and a poor vigilance for DNA mutation. It could be a more specific test when compared to the viral presence through a Polymerase Chain Reaction (PCR) or Hybrid Capture¹⁵.

Our case and control study views the assessment of the anti-p16ink^{4a} sensitivity, specificity, positive and negative predictive value in conventional cervical cytology, in addition to the feasible use of the anti-p16ink^{4a} on slides of cervical cytology.

Method

A case-control study was performed recruiting women who attended the reference clinic of Cervical Pathology in the City of Porto Alegre, Southern Brazil. The Clinic provides assistance to suspected cases of cervical pathology screened at eleven health care units. According to the census of IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics) on the year 2000 there were 181.095 inhabitants dwelling in the area attended by the health care units, of which 93.883 were women, with average familiar income ranging from 2.60 to 7.54 minimum Brazilian wages³⁷. The health units were contacted to refer all suspected cases of cervical pathology to the Clinic Reference to the management.

The sample was selected from two different groups: the first, had patients referred to the Reference Clinic which were recently screened and suspected of cervical lesions; the second, had patients attended directly in the Clinic without previous screening.

The criteria of inclusion in the control group were the concurrence of negative cervical cytology for intra-epithelial or invasive neoplastic lesion, associated with normal colposcopy findings. Cases were defined by the presence of a positive cervical biopsy with CIN (cervical intra-epithelial neoplasia) 1, 2 or 3 or cervical cancer.

Patients with complete hymen, absence or impossibility of exposition of the cervix, history of cervical conization, pregnant patients, patients with vaginitis/cervicitis (according to clinical-microscopic evaluation), disable patients and cases of rejection to participate in the study have been excluded.

Picture 4 presents the flowchart of the selection process of the sample of the total number of women screened (n=287) from January 2004 to July 2005.

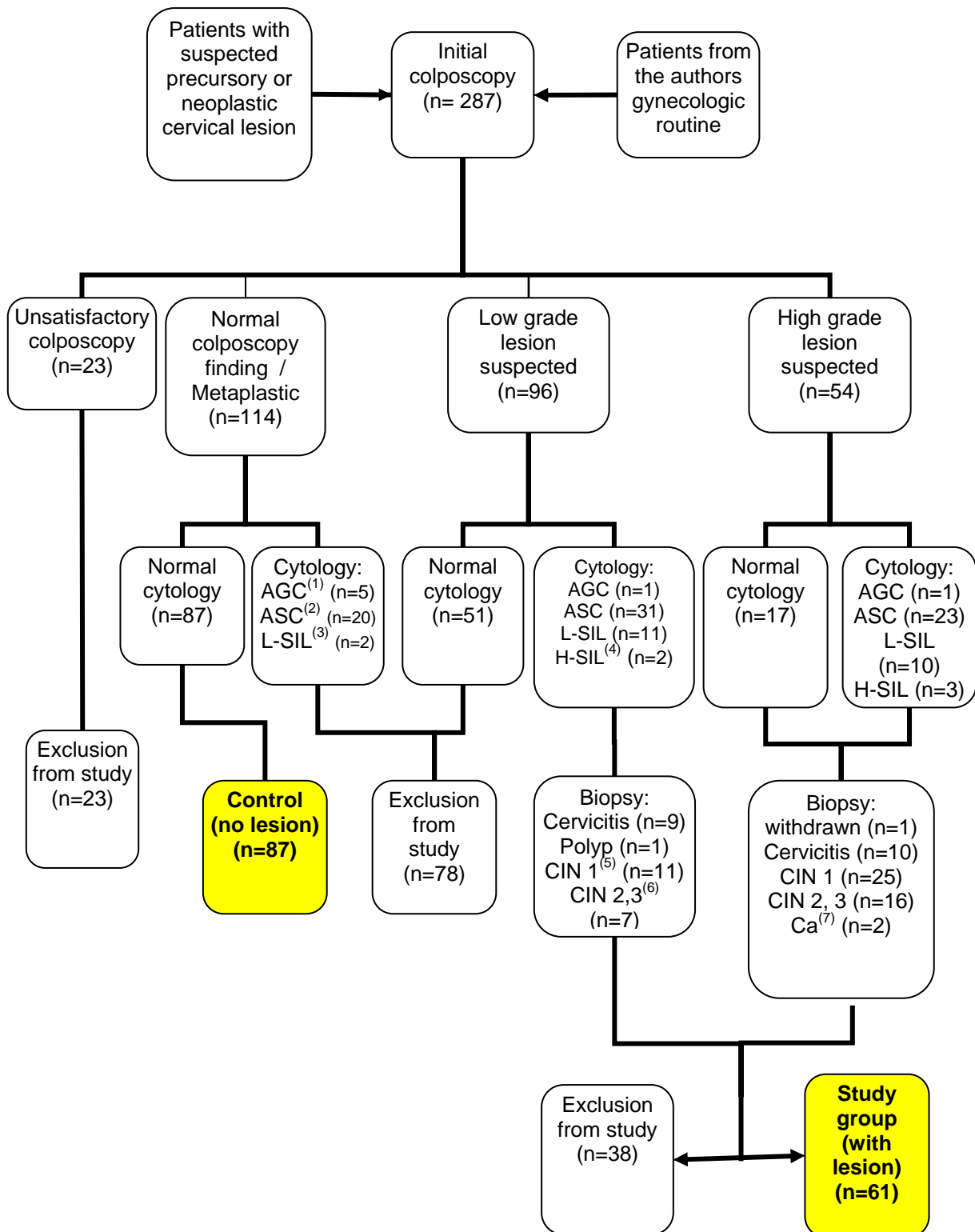


Figure 4: Flowchart of the sample selection process

- (1) AGC = atypical glandular cells
- (2) ASC = atypical squamous cells
- (3) L-SIL= low-grade squamous intraepithelial lesion
- (4) H-SIL = high-grade squamous intraepithelial lesion
- (5) CIN 1 = Cervical intraepithelial neoplasia grade 1
- (6) CIN2/3 = Cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3
- (7) CA = Squamous cervical carcinoma

Procedure

Between January 2004 and July 2005, two hundred eighty seven women with and without suspicion of neoplastic or precursory cervical lesion were referred to the Clinic of Cervical Pathology. All were invited to participate on the study and were presented with the Term of Informed Consent (**attached 1**). Upon agreement to the participation, they filled a standardized questionnaire that approached the clinic-epidemiological characteristics of the patient (**attached 2**).

Samples were collected for conventional cytological exam (*Papanicolaou*) and a ICQ cytological exam (immunocytochemistry) was performed with antibodies diagnostic test with anti-p16ink^{4a} (clone G175-405 in dilution 1:100 of Pharmingen / BD Biosciences of Brazil). The immunocytochemistry technique used was the labeled streptavidin-biotin (LSAB) (**attached 3**) and the technique used for the slides of conventional cytology was *Papanicolaou* (**attached 4**).

The samples were held in sequence, starting with the immunocytochemistry cytology (ICQ) followed by the conventional cytology (*Papanicolaou*). In order to get enough material to represent the squamous-colunar junction and the transformation zone of the uterine cervix, the cytological examinations had been collected as usual with the use of the spatula of Ayre[®]

(rotation of 360° in the peri-orificial region of the uterine cervix) and cervical brush *cytobrush*[®] (rotation of 90° in the endocervix) individually and disposable³⁸.

The slide used for cytological ICQ was previously prepared in a standardized manner, by the laboratory of the Research Center of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, where the surface for staining presented adherent layer of 3-aminopropyl(triethoxy)silane^{39,40}, targeting at the minimization of the cellular detachment during the processes of "washing up" in the immunocytochemistry. The cellular clamp used in both slides was alcohol 96% with poliethilenoglicol. The colposcopy was carried out with maximization equipment of binocular image DFV[®] with a seven times fixed increase of and with the usual solutions: acetic acid 5%, *Schüller* iodine-iodetad solution and physiological solution.

The cytological classification used on the conventional reading of the slides was Bethesda 2001 (**attached 5**)⁴¹. The colposcopic classification used was the International Federation of Cervical and Colposcopy Pathology approved in 2002 and recommended by the Brazilian Association of Genytoscopy (**attached 6**).

According to the initial conventional cytological and colposcopic evaluation a diagnostic biopsy of the uterine cervix was carried following the consensual indications of the American Society of Cervical Colposcopy and Pathology^{42,43}: cytology compatible with H-SIL and satisfactory colposcopy compatible with lesion of high grade, were forwarded to early cervical biopsy. The cases of L-SIL, ASC-US, ASC-H, AGC and normal colposcopy or colposcopy compatible with metaplastic alteration, had been followed in semester intervals and biopsy in case there was a worsening of the cyto-colposcopic setting. In this group, the initial presence of satisfactory colposcopy compatible with lesion of low or high grade, in the initial evaluation, was followed by early cervical biopsy. The cases of unsatisfactory colposcopies had been excluded from the study.

The biopsies had occurred under local infiltrative anesthesia with lidocayne 2% and drill Baliú type with fragment(s) preserve in formalin 10% and read under hematoxilin-eosin standard staining. The diagnosis of the biopsy parts followed the Richart's criteria, where were diagnosed as absence of precursory lesion, CIN 1, CIN 2 and CIN 3 besides the cervical carcinoma (**attached 7**)^{43, 44}.

The criterion for ICQ slides positivity was adapted from Bibbo, Pientong and Saheballi studies^{3, 45, 46}. The presence of cervical epithelial cells with brown positivity characteristics in number ≥ 10 , was considered as positive slide. Among these, three categories were divided: 1) weak cytoplasmatic positivity, 2) strong cytoplasmatic positivity and 3) nuclear positivity. The ICQ slides had been evaluated by two "blinded" and independent pathologists (P1 and P2) and the results were compared to cytological, colposcopic and histological findings.

Sample Size Estimation

The sample size calculation was based on previous studies that had approached the performance of the antibody anti-p16ink^{4a} in cytology, linked to the cervical standard exam or diagnosed biopsy stain with hematoxilin and eosin.

Considering the maximum positivity found among individuals without lesion in 18% of times³², the minimum positivity found among cases of CIN 1 in 60% of times⁴⁷ and minimum positivity found among cases of CIN 2 or 3 in 80% of times³³, the use of statistical package PEPI version 4.0 (Computer Programs for Epidemiologists) resulted in minimum sample size of 31 cases of CIN 1, 15 cases of CIN 2 or 3 and 46 controls. The parameters used were 95% alpha, 10% beta (90% study power) with 1:1 control-case ratio.

Statistical Analysis

The epidemiological characteristics of the sample were described regarding quantitative (age, sexarca, number of sexual partners in the life and over the last 12 months, schooling and gestations) and qualitative variables (contraceptive method used, history of HIV serum positivity and history of sexual transmitted disease, post-menopause state and reason for further investigation).

The quantitative variables with symmetrical distribution were described as mean and standard-deviation and with asymmetrical distribution, with median and inter-quartile range.

The statistical package SPSS 13,0 (Statistical Package for the Social Sciences) was used to perform the analysis. Comparisons using the Student "t" Test were done for variables with normal distribution and the Wilcoxon-Mann-Whitney test "U" for those asymmetrically distributed. The Pearson chi-square test was used for categorical variables. Contingency tables (2 x 2) were created for the calculation of sensitivity, specificity, positive and negative predictive value and plotted on the computer program *Epi-info 6.0* (95% CI).

Diagnostic test was considered positive when cytology ICQ resulted positive for the anti-p16ink^{4a} in nucleus or cytoplasm and a negative test, on the absence of positivity. Present of disease was the investigation which resulted in positive cervical biopsy for CIN 1, 2, 3 or cervical carcinoma and, absent disease, the investigation which resulted in negative conventional (*Papanicolaou*) cytology and colposcopy with normal findings.

Ethical Issues

The study was approved by the Ethical research committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (Federal University) and Porto Alegre City Hall under the numbers 04-241 and 001.010889.04.3.

Results

The samples resulted were composed by eighty seven patients considered free of precursory or neoplastic cervical lesion (controls) and sixty one patients presenting the lesion (cases). **Table 1** shows the main socio-demographic variables among cases and controls.

The variable "number of sexual partners in the life", showed a statistically significant difference among the groups. The average was three partners (2 to 5) in the study group and two partners (1 to 3) in the control group. When only the cases with uterine cervix histological lesion were assessed, the average age for the intraepithelial lesion diagnosis of CIN 1 was 32.9 ± 10.9 years and among CIN 2 or 3 was 26.8 ± 6.3 years, without significant difference between the two groups. The carcinoma cases occurred in the sixth and seventh decades of life.

The combined oral contraceptive was the main reported contraceptive method, being 65.6% (n=40) in the study group and 50.6% (n=44) in the control group. It was reported a low preference to the exclusive use of masculine condoms 9.8% (n=6) in the study group and 11.5% (n=10) in the control group. The clinical diagnosis of post-menopause state (history of amenorrhea for one year or more associated with typical symptoms such as flushes, reduction of the libido, secondary dyspareunia and vaginal epithelium atrophy alterations)⁴⁸, occurred in 9.8% (n=6) in the study group and 21.8% (n=19) in the control group. Patients referred to the Clinic of Cervical Pathology upon abnormal cytological examination were 37.8% (n=56) and clinical suspected cervical lesion were 25.7% (n=38). History of HIV serum-positivity occurred in two cases on the study group and one case on the control group.

Investigation results Variable	no cervical lesion (n=87)	CIN 1, 2, 3 ⁽¹⁾ or CA ⁽³⁾ (n= 61)	p-value
Age (years)	33.8 ± 14.4	30.4 ± 9.7	0.09
Sexarca (age of 1st sexual intercourse)	16.7± 2.4	16.5 ± 2.5	0.66
Nº sexual partners in life			
≤ 2	54% (n=47)	36.1% (n=22)	
3 a 5	39.1% (n=34)	44% (n=27)	<0.05
≥ 6	6.9% (n=6)	19.7% (n=12)	
Nº sexual partners over the last 12 months	1.0 (1-1)	1.0 (1-1)	0.79
Schooling (years of study)	8.4 ± 3.0	8.8 ± 2.7	0.42
Pregnancies	2.0 (1-3)	2.0 (1 - 2.5)	0.73
History of STD (sexually transmitted disease) ⁽²⁾	11.5% (10 casos)	9.8% (6 casos)	0.8

Table 1: Socio-demographic variables of studied (n=148)

⁽¹⁾ CIN = Cervical intra-epithelial neoplasia grade 1, 2 or 3

⁽²⁾ STD = Refers to clinical information collected compatible with sexually transmitted diseases such as genital condilomatosis, vesiculations, ulcerations and vulvo-vaginal cancrs.

⁽³⁾ CA = Cervical carcinoma

Table 2 presents the results of a colposcopic investigation carried out with 148 patients included on the study.

From the patients with colposcopy suspected low grade lesions (n=96), twenty eight were biopsed: eighteen confirmed cervical lesions, nine presented inflammatory diagnosis (chronic cervicitis) and one cervical polyp. For the patients with suspected high grade lesions on colposcopy (n=54), forty three biopsed women presented histological lesion. In this group, of the eleven remaining patients, ten were biopsed and presented chronic inflammatory processes (chronic cervicitis) and one patient did not attend the procedure. Positive predictive

value of the suspected lesion of high grade colposcopy for cervical histological lesion was 0.80.

Investigation results	Non biopsed	Cervicitis/ Polyp	CIN* 1	CIN* 2 or CIN* 3	Squamous carcinoma	total
Colposcopy						
Normal finding or metaplastic	87	0	0	0	0	87
Compatible low grade lesion	68	10	11	7	0	96
Compatible high grade lesion	1	10	25	16	2	54

Table 2: Results of the colposcopy according to the cervical histological diagnosis (n=148)

(*)CIN: Cervical intra-epithelial neoplasia grade 1, 2 or 3

The description of the cytological findings with the anti-p16ink^{4a} between the two pathologists in the different histological diagnostic can be found on **table 3**.

It is shown that the positivity to antibody was less frequent among patients without lesion and higher among those with cervix histological lesion. It is highlighted that the nuclear positivity was only found among cases of CIN 2, 3 and the strong cytoplasmatic positivity only among patients with cervix histological lesion (CIN 1, 2, 3). The two cases of squamous carcinoma presented strong cytoplasmatic positivity between the two pathologists. Among those with absence of histological lesion, the antibody had, at most, a weak cytoplasmatic positivity and in a small percentage of patients.

The Inter-observer variation (kappa index), found for cytology with the antibody, was 0.65 when data was evaluated globally (without positivity, weak and strong cytoplasmatic positivity besides the nuclear one). When data was evaluated in detail excluding the subjective criterion (strong or weak of the cytoplasmatic positivity) and keeping only three groups

(without positivity, cytoplasmatic positivity and nuclear positivity), Kappa index was 0.74. When the percentile difference was evaluated between the pathologists, scores of less than 5% are shown on the extreme groups of the investigation: CIN 2, 3 associated with nuclear positivity for the antibody and absence of lesion associated with an absence of positivity for the antibody.

Among patients with CIN 2, 3, there is a low Inter-observer variation when there is nuclear positivity (percentile difference 4.3%) and, when there is an absence of histological lesion and absence of positivity for the anti-p16ink^{4a}, the difference in the Inter-observer variation is 4.6%. However among CIN 1 patients, there is an important inter-observer variation.

Investigation results cytology ICQ ⁽³⁾	No lesion (n=87)		CIN 1 ⁽¹⁾ (n=36)		CIN 2 e 3 (n=23)		squamous carcinoma (n=2)	
	P1 ⁽²⁾	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
No positivity	77 (88.5%)	73 (83.9%)	8 (22.2%)	15 (41.7%)	0	1 (4.3%)	0	0
Weak cytoplasmatic positivity	10 (11.5%)	14 (16.1%)	28 (77.8%)	14 (38.9%)	3 (13%)	7 (30.4%)	0	0
Strong cytoplasmatic positivity	0	0	0	7 (19.4%)	13 (56.5%)	9 (39.1%)	2 (100%)	2 (100%)
Nuclear positivity	0	0	0	0	7 (30.4%)	6 (26.1%)	0	0

Table 3: Performance of the anti-p16ink^{4a} antibody on the sample (n=148)

⁽¹⁾ CIN: Cervical intra-epithelial neoplasia grade 1, 2 or 3

⁽²⁾ P1 = pathologist one, P2 = pathologist two

⁽³⁾ ICQ = Immunocytochemistry with anti-p16ink^{4a}

The graphic representation of the performance of antibody anti-p16ink^{4a} is presented in **figure 5**. The investigation results are dichotomized between absent of lesion (negative Papanicolaou cytology plus normal or metaplastic colposcopic view) and lesion (diagnostic biopsy with CIN 1,2,3 or cervical cancer).

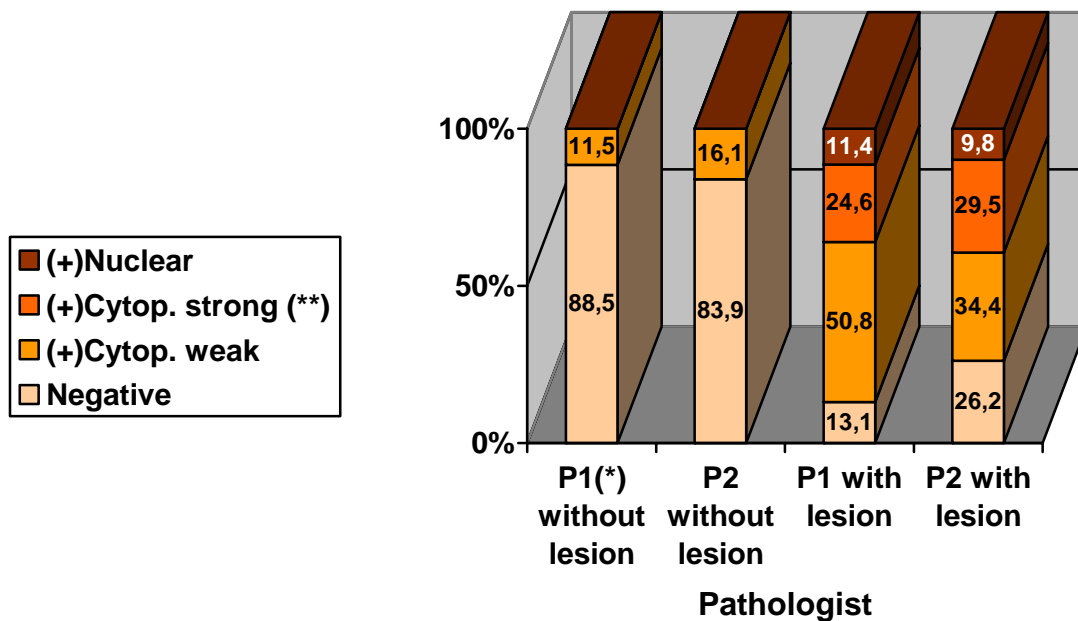


Figure 5: Performance of the antibody anti-p16ink^{4a} in cervical cytology according to investigation results and pathologist

(*) P1 = pathologist 1, P2 = pathologist 2

(**) (+) Citop. = Positivity of antibody anti-p16ink^{4a} in cytoplasm

The performance of the antibody regarding sensitivity and specificity is seen on **table 4**, data is presented according to histological diagnosis and a pathologist.

The greater sensibility and the lower inter-observation variation between CIN 2, 3 and cervical squamous carcinoma is highlighted. Nonetheless among CIN 1 cases, there is less sensitivity and greater inter-observation variation.

Measure (IC 95%)	CIN ⁽²⁾ 1 (n=36)		CIN 2 e 3 (n=23)		CIN 1, 2 e 3 (n=59)		squamous carcinoma (n=2)	
	P 1 ⁽¹⁾	P 2	P 1	P 2	P 1	P 2	P 1	Pt 2
Sensitivity	77.8% (60.4–89.3)	58.3% (40.9–74.0)	100.0% (82.2–100)	95.7% (76.0–99.8)	86.4% (74.5–93.6)	72.9% (59.5–83.3)	100.0% (19.8–100)	100.0% (19.8–100)
Specificity	88.5% (79.4–94.1)	83.9% (74.1–90.6)	88.5% (79.4–94.1)	83.9% (74.1–90.6)	88.5% (79.4–94.1)	83.9% (74.1–90.6)	88.5% (79.4–94.1)	83.9% (74.1–90.6)

Table 4: Diagnostic antibody anti-p16ink^{4a} in cervical cytology

⁽¹⁾ P1 = pathologist one, P2 = pathologist two

⁽²⁾ CIN: Cervical intra-epithelial neoplasia grade 1, 2 or 3

The performance of the antibody regarding positive and negative predictive values is presented in **table 5**, according to histological diagnosis and pathologist. For the probability of cervical lesion after positive cytological ICQ test (predictive positive values) and absence of cervical lesion after negative cytological ICQ test (predictive negative values), the study group was divided into CIN 1 or worse (CIN1 + CIN 2 + CIN 3 + carcinoma), CIN 2 or worse (CIN 2 + CIN 3 + carcinoma) and cervical squamous carcinoma. The predictive negative value, of the antibodies in cervical cytology, was from 82% up to 100% between the pathologists and different histological diagnosis.

Histopa- tology	CIN 1 ou > ⁽¹⁾ (n=61)		CIN 2 ou > ⁽²⁾ (n=25)		CA ⁽³⁾ (n=2)	
	P1 ⁽⁴⁾	P2	P1	P2	P1	P2
Measure (IC 95%)						
Positive predictive value	84.1% (72.3 – 91.7)	76.3% (63.1 – 86.0)	39.7% (27.8 – 52.8)	40.7% (28.3 – 54.2)	3.2% (0.6 - 12)	3.4% (0.6 – 12.7)
Negative predictive value	90.6% (81.8 – 95.6)	82% (72.1 – 89.1)	100% (94.6 - 100)	98.9% (93 – 99.9)	100% (94.6 - 100)	100% (94.8 - 100)

Table 5: Cervical cytology with antibodies anti-p16ink^{4a}: positive and negative predictive values

- (1) CIN 1 + CIN 2 + CIN 3 + Carcinoma
- (2) CIN 2 + CIN 3 + Carcinoma
- (3) CA = Squamous cervical carcinoma
- (4) P1= Pathologist 1, P2 = Pathologist 2

The description of the joint findings of conventional (*Papanicolaou*) and ICQ cytologies, according to histological results, are seen on **table 6** where cytology ICQ was dichotomized in negative and positive (weak and strong cytoplasmatic positivity besides nuclear positivity). The conventional cytology was grouped into two categories: normal (negative and atrophy) and atipy (ASC-US, ASC-H and AGC).

The analysis of the table shows that, when the conventional cytology was negative, the use of the diagnostic test with the antibody was an aid to the diagnosis of five CIN 2 or 3 and an cervical carcinoma according to pathologist 1 and four CIN 2 or 3 and cervical carcinoma according to pathologist 2. For CIN 1 cases, the use of the diagnostic test with the antibody aided ten cases between the two pathologists. In the conventional cytology atipy group, the use

of the antibody, aided the diagnosis of eight CIN 2 or 3 and a case of cervical carcinoma between the two pathologists.

Investigation results		no cervical lesion (n=87)		CIN 1 ⁽³⁾ (n=36)		CIN 2, 3 (n=23)		squamous carcinoma (n= 2)		
		P1 ⁽¹⁾	P 2	P 1	P 2	P 1	P 2	P 1	P 2	
Cytology	Conventional cytology (<i>Papanicolaou</i>)									
	Negative	-	62	58	4	4	0	1	0	0
		+	4	8	10	10	5	4	1	1
	Atipy	-	14	14	2	6	0	0	0	0
		+	5	5	12	8	8	8	1	1

Table 6: Association of conventional cytologies (*Papanicolaou*) and ICQ cytologies (anti-p16ink^{4a})

⁽¹⁾ P1 = pathologist one, P2 = pathologist two

⁽²⁾ ICQ = Immunocytochemistry

⁽³⁾ CIN: Cervical intra-epithelial neoplasia grade 1, 2 or 3

Based on the data presented in table 5, sensitivity and specificity had been recalculated using both diagnostic methods. In this case, it was considered as negative test only those on negative conventional cytology associate to also negative cytology ICQ. All the other tests were considered positive, such as conventional cytology with atipy, L-SIL or H-SIL or cytological ICQ, with any degree of cytoplasmatic or nuclear positivity.

Data can be found on **table 7**, presenting the increase on sensitivity as well as on the negative predictive value among cervical lesion cases, especially in the L-SIL cases.

Histo- patho- logy	CIN 1 ⁽²⁾ (n=36)		CIN 2 e 3 (n=23)		CIN 1, 2 e 3 (n=59)		squamous carcinoma (n=2)	
	P1 ⁽¹⁾	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
Measure (IC 95%)								
Sensitivity	88.9% (73.0-96.4)	88.9% (73.0-96.4)	100.0% (82.2- 100.0)	95.7% (76.0-99.8)	93.2% (82.7-97.8)	91.5% (80.6-96.8)	100.0% (19.8- 100.0)	100.0% (19.8- 100.0)
Specificity	71.3% (60.4-80.2)	66.7% (55.7-76.2)	71.3% (55.7-76.2)	66.7% (55.7-76.2)	71.3% (60.4-80.2)	66.7% (55.7-76.2)	71.3% (60.4-80.2)	66.7 (55.7-76.2)

Table 7: Association of conventional cytology and ICQ for the diagnosis of cervical lesion:

⁽¹⁾ P1 = pathologist 1, P2 = pathologist 2

⁽²⁾ CIN: Cervical intra-epithelial neoplasia grade 1, 2 or 3

Discussion

In the present study, the sensitivity and the negative predictive value with the used diagnostic method showed an appropriate performance on CIN 2, 3 and CA cases with results superior to 70%. Such results reproduce the findings of literature that had approached the cervical cytology with the antibody proposed^{32-34, 47}.

- On precursory cervix lesion patients, when evaluated together (CIN 1, 2 or 3), the study reproduces literature findings with sensitivity ranging from 75,4%³⁴ up to 92,3%⁴⁷.
- On CIN 1, sensitivity of the diagnostic test was 77.8% and 58.3% between pathologists 1 and 2 respectively, partially following literature findings where there is variation from 54,3%³⁴ up to 74,1%³².

- Pientong and cols, published in 2003, found 33% sensitivity among CIN 1 cases, however, the study presented methodology mistakes, since the collections occurred only with spatula of *Ayre*, the dilution of the antibody was 1:400 and there wasn't a histological confirmation of the cases³.

On cases of strong cytoplasmatic positivity or nuclear positivity, verified mainly with CIN 2, 3 or cervical cancer, same findings of literature are seen. When positivity to the antibody was evaluated of distinctively between cytoplasm and nucleus, study of Saqi and cols were: 90% sensitivity among CIN 2, 3 and 100% among invasive lesion³². Bibbo and cols, found a 94.4% sensitivity between CIN 2, 3³³ cases.

As for the inter-observer variation, using the proposed methodology on the study (absence of positivity, weak and strong cytoplasmatic positivity and nuclear positivity), an agreement only on cases of CIN 2, 3 and nuclear positive diagnostic test is found. Similarly, there is an agreement between the absence of lesion and the negative diagnostic test, besides the strong cytoplasmatic positivity between the two cases of invasive lesion. In these extremities, the percentile difference between the pathologists was inferior to 5%.

However, on CIN 1 cases and mainly when using the subjective criterion of the cytoplasmatic evaluation there was an important inter-observer variation.

The kappa index of the study reached only 0.74 when the subjective criterion of the cytoplasmatic evaluation was removed. Such results were reproduced on a recent study of Negri and cols⁴⁷, published in 2006 which found 66.6% sensitivity between CIN 1 cases and kappa index of 0.77. It highlights the exiguities of the sample used by the researcher, who found six cases of CIN 1.

Among the two cases of carcinoma, which occurred on the sixth and seventh decades of life, therefore in hypostrinic state, positivity was found on the cytoplasm between the two pathologists. This finding is predictable on medical literature, since the considered antibody

does not react with deteriorate cells including those of neoplastic origin³. Probably the positivity mentioned referred to circumjacent tissues to the invasive lesion, still in precursory state.

The use of the joint findings of conventional *Papanicolaou* cytologies and ICQ was proposed in order to understand false-negative cases of the former. The two cases of carcinoma were found on normal conventional cytologies or with atypical alterations (ASC, AGC). On this exact group there were thirteen and twelve CIN 2, 3 lesions according to pathologists 1 and 2 respectively. All these groups had something in common which is the positivity for antibody anti-p16ink^{4a}. In a recent revision of literature, a similar association for comparisons was not found.

As for the negative predictive values in the study, the variation was 82% (CIN 1 or worse) up to 100% (CIN2 or worse). This measure is essential for population screening test where high values for negative predictive values are secure for diagnostic of illness absence. Trunk and cols.¹⁷, found negatives predictive values higher than 90% between CIN 1 (or worse) and CIN2 (or worse). Saqi and cols.³² found negative predictive values as 74,2% between CIN 1 or worse and 96,8% between CIN 2 or worse.

The present study did not evaluate the presence of HPV on the selected sample, which would elucidate the understanding of doubtful cases:

- The cytoplasmatic positivity found on 10 to 14 patients without cervical lesion according to pathologist one and two respectively;
- The cases of CIN 1 presented with greater discrepancy among observers associated to the inferior sensitivity of the method.

Authors claim that contrary to what is cited on the medical literature, the use of the antibody anti-p16ink^{4a} did not present difficulties of diffusion in staining, during the process of immunocytochemistry, cited as threshold on studies that had not used liquid-base cytology³⁶.

So, the antibody anti-p16ink^{4a} was considered, by the authors, as a feasible test for the following up of cervical lesions.

References:

1. Sawaya GF. Papanicolaou testing: when does more become less? *Am J Med* 2005; 118(2):159-160.
2. Felix JC, Amezcua C. In vitro adjuncts to the pap smear. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):685-99, vii.
3. Pientong C, Ekalaksananan T, Swadpanich U et al. Immunocytochemical detection of p16INK4a protein in scraped cervical cells. *Acta Cytol* 2003; 47(4):616-623.
4. Nanda K, McCrory DC, Myers ER et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review *Ann Intern Med* 2000; 132(10):810-819.
5. Schneider V, Henry MR, Jimenez-Ayala M, Turnbull LS, Wright TC. Cervical cancer screening, screening errors and reporting. *Acta Cytol* 2001; 45(4):493-498.
6. Bergeron C, Debaque H, Ayivi J, Amaizo S, Fagnani F. Cervical smear histories of 585 women with biopsy-proven carcinoma in situ. *Acta Cytol* 1997; 41(6):1676-1680.
7. Sato S, Mikino H, Matsunaga G, Yajima A. False negative rate in mass screening for cervical cancer. *Acta Cytol* 1998; 42(3):836-837.
8. Cohn DE, Herzog TJ. New innovations in cervical cancer screening. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44(3):538-549.
9. Ienbach-Hellweg G, Trunk MJ, von Knebel DM. Traditional and new molecular methods for early detection of cervical cancer. *Arkh Patol* 2004; 66(5):35-39.
10. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide *J Pathol* 1999; 189(1):12-19.
11. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19(1-2):1-5.
12. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(8):930-934.
13. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(4):244-265.
14. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2001; 8(2):83-92.
15. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7):884-891.

16. Stanley MA. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. *Virus Res* 2002; 89(2):241-248.
17. Trunk MJ, Ikenbach-Hellweg G, Ridder R et al. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol* 2004; 48(6):771-782.
18. Lin WM, Ashfaq R, Michalopoulos EA, Maitra A, Gazdar AF, Muller CY. Molecular Papanicolaou tests in the twenty-first century: molecular analyses with fluid-based Papanicolaou technology
Am J Obstet Gynecol 2000; 183(1):39-45.
19. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7):2407-2414.
20. Murphy N, Ring M, Heffron CC et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58(5):525-534.
21. Tringler B, Gup CJ, Singh M et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2004; 35(6):689-696.
22. Wang JL, Zheng BY, Li XD et al. p16INK4A and p14ARF expression pattern by immunohistochemistry in human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Mod Pathol* 2005; 18(5):629-637.
23. Negri G, Vittadello F, Romano F et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004; 445(6):616-620.
24. Murphy N, Heffron CC, King B et al. p16INK4A positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. *Virchows Arch* 2004; 445(6):610-615.
25. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Fu E. Expression of p16INK4A in Pap smears containing atypical glandular cells from the uterine cervix. *Acta Cytol* 2004; 48(2):173-180.
26. Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L et al. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. *J Pathol* 2003; 201(4):535-543.
27. Ishikawa M, Fujii T, Masumoto N et al. Correlation of p16INK4A overexpression with human papillomavirus infection in cervical adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(4):378-385.
28. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(2):187-193.

29. Murphy N, Ring M, Killalea AG et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003; 56(1):56-63.
30. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16(7):665-673.
31. Klaes R, Benner A, Friedrich T et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(11):1389-1399.
32. Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P. Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (SurePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002; 27(6):365-370.
33. Bibbo M, DeCecco J, Kovatich AJ. p16INK4A as an adjunct test in liquid-based cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 2003; 25(1):8-11.
34. Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B et al. Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol* 2004; 31(4):235-242.
35. Ichinose H. p16INK4a IHC in the diagnosis of cervical CIN. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(9):1284.
36. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92(2):276-284.
37. Prefeitura Municipal de Porto Alegre - Bairros Oficiais. Secretaria do Planejamento Municipal - Porto Alegre RS Brasil . 10-7-2004.
Ref Type: Internet Communication
38. Luzzatto R, Boon ME. Contribution of the endocervical Cytobrush sample to the diagnosis of cervical lesions. *Acta Cytol* 1996; 40(6):1143-1147.
39. Dyanov HM, Dzitoeva SG. Method for attachment of microscopic preparations on glass for in situ hybridization, PRINS and in situ PCR studies. *Biotechniques* 1995; 18(5):822-4, 826.
40. Taylor S, Smith S, Windle B, Guiseppi-Elie A. Impact of surface chemistry and blocking strategies on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(16):e87.
41. Solomon D, Davey D, Kurman R et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287(16):2114-2119.
42. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; 287(16):2120-2129.

43. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Carlson J, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(1):295-304.
44. Crum CP. Symposium part 1: Should the Bethesda System terminology be used in diagnostic surgical pathology?: Point. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(1):5-12.
45. Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 2002; 46(1):25-29.
46. Sahebali S, Depuydt CE, Segers K et al. p16INK4a as an adjunct marker in liquid-based cervical cytology. *Int J Cancer* 2004; 108(6):871-876.
47. Negri G, Moretto G, Menia E et al. Immunocytochemistry of p16INK4a in liquid-based cervicovaginal specimens with modified Papanicolaou counterstaining. *J Clin Pathol* 2006; 59(8):827-830.
48. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of menopause. *Endocr Pract* 2006; 12(3):315-337.

Artigo em Português

Expressão do Anticorpo Anti-p16ink^{4a} em Citologia Cervical

Alexandre da Silva Rocha, Mary Clarisse Bozzetti, Luciana Schmidt Kirschnick, Maria Isabel
Albano Edelweiss

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

Endereço para correspondência:
Alexandre da Silva Rocha
dralexandrocha@terra.com.br
Rua Frei Germano n° 200/503B
Bairro São José CEP 91530-060
Porto Alegre / RS
Brasil

Resumo

Introdução: O uso do anticorpo anti-p16ink^{4a}, visando aumento da sensibilidade no exame citológico, tem apresentado resultados promissores; entretanto há carência de estudos utilizando o anticorpo monoclonal em citologia cervical associado ao exame histológico do colo uterino. **Objetivos:** avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do anticorpo anti-p16ink^{4a} em citologia cervical. **Método:** Estudo de casos e controles realizado em ambulatório de patologia cervical. As lâminas de citologia, para imunocitoquímica com o anticorpo, foram coletadas com espátula de Ayre e escova tipo *cytobrush*. A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas independentes (P1 e P2). Foram considerados casos (n=61), as investigações cervicais que resultaram em biópsia diagnóstica compatível com lesão intra-epitelial de baixo grau (NIC 1), alto grau (NIC 2/3) ou carcinoma invasor (CA). Foram considerados controles (n=87), as investigações que contavam com colposcopia normal e citologia, corada pelo método de *Papanicolaou*, negativas. **Resultados:** A sensibilidade para o diagnóstico das NIC 2/3 (n=23) foi de 100% (P1) e 95,7% (P2). Já o valor preditivo negativo nos diagnósticos de NIC2 ou pior foi de 100 (P1) e 98,9 (P2). Nos dois casos de carcinoma epidermóide, a sensibilidade foi de 100% para ambos patologistas. A sensibilidade para o diagnóstico das NIC1 foi de 77,8% (P1) e 58,3% (P2). O valor preditivo negativo entre as NIC1 foi de 90,6 (P1) e 82 (P2). O índice kappa entre os dois patologistas foi de 0,74. Entre os casos de NIC 2/3 associado à positividade nuclear ao anticorpo, a diferença percentual entre os patologistas foi inferior a 5%. Mesmo escore encontrado entre os casos de ausência de lesão cervical e negatividade para o anticorpo. Já entre as portadoras de NIC1, houve maior variação inter-observador. **Conclusões:** Os resultados apresentados apontam o anticorpo anti-p16ink^{4a} como auxiliar no rastreamento de lesões precursoras ou neoplásicas em citologia cervical.

Introdução

Desde a introdução do exame citológico cervical em forma de programa de rastreamento populacional, que a morbidade e a mortalidade do câncer da cérvix vêm decrescendo¹. Idealizado para possuir grande sensibilidade no diagnóstico de alterações cervicais, vem apresentando sensibilidades desapontadoras médias de 0,51 (IC 95% 0,37 - 0,66), sendo mais acurado entre lesões cervicais precursoras de alto grau²⁻⁴.

Verifica-se que, em países com coberturas de coletas ultrapassando 85%, metade dos casos de câncer cervical ocorram em mulheres que não foram testadas nos últimos cinco anos e, entre as testadas, 12 a 23% possuam falhas no rastreamento⁵.

Aproximadamente 60% das falhas do exame citológico cervical são devidas à coleta inadequada e o restante, a erros laboratoriais⁶⁻⁸. Espera-se que, entre aquelas diagnosticadas como portadoras de câncer cervical, a revisão de seus exames citológicos “normais”, ocorridos nos últimos três anos, sejam reclassificados para lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (HSIL) em 40% das vezes⁶.

Apesar de não possuímos um marcador diagnóstico ideal para o rastreamento de lesões cervicais, sabe-se que este deverá possuir alta sensibilidade, não depender de critérios subjetivos para sua leitura, ser de custo acessível e aplicável em amostras facilmente coletadas⁹.

A influência do papilomavírus humano (HPV) na gênese das lesões precursoras ou neoplásicas cervicais vêm sendo apontada por inúmeros estudos nas últimas décadas¹⁰⁻¹³, sendo encontrado virtualmente em todos os casos de câncer cervical, de acordo com a sensibilidade do método de detecção empregado¹².

A identificação de intermediários produzidos pela incorporação do genoma do HPV nas células epiteliais cervicais, evitando o simples diagnóstico da presença do DNA viral, torna-se promissor como elemento diagnóstico em cérvix¹⁴⁻¹⁶.

O uso dos marcadores moleculares têm sido citados como adjuvantes na leitura do esfregaço durante o exame microscópico^{14, 17}. Para as lesões de origem escamosa o PCNA, ki-67 (MIB1), ciclina-E e o anti-p16ink^{4a}; entre as glandulares, o MN, cd44, ki-67 e o anti-p16ink^{4a}, além de outros, são potenciais candidatos a marcador diagnóstico de células precursoras ou neoplásicas no exame citológico cervical^{14, 17}. A proposta do uso dos marcadores diagnósticos, seria a de destaque das células alteradas, já durante o exame microscópico de baixa magnificação, minimizando a habituação na leitura dos esfregaços¹⁷.

O processo de carcinogênese da cérvix dá-se em etapas de eventos moleculares, no nível celular epitelial, com a produção de intermediários passíveis de marcação diagnóstica. Não há consenso quanto ao melhor intermediário preditor da carcinogênese na cérvix, onde seu diagnóstico poderá discriminar casos de progressão neoplásica¹⁸.

O PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) e o ki67 mostraram-se como marcadores de proliferação celular; a ciclina-E e o ki67 que diferenciariam as lesões dos tecidos normais cervicais^{14, 15}; o p53 como marcador de proliferação celular e progressão tumoral¹⁹; o anti-p16ink^{4a} como marcador de lesão cervical precursora em citologia e histologia, marcador da infecção pelo HPV em células cervicais e como auxiliar na redução da variação inter-observador em lesões histológicas cervicais^{15, 19-36}.

Dentre as várias alternativas diagnósticas em cérvix, o anticorpo anti-p16ink^{4a} se mostra promissor no aprimoramento da sensibilidade na citologia cervical. Entretanto há carência de estudos utilizando o anticorpo em citologia convencional, associado ao exame padrão-ouro cervical (biópsia dirigida por colposcopia e corada com hematoxilina-eosina).

Sugere-se que, em amostras citológicas ou histológicas cervicais, o anticorpo anti-p16ink^{4a} funcione como um “detector citopático” da presença do HPV integrado ao genoma celular, induzindo mitose desregulada e precária vigilância para mutações do DNA. Seria teste

mais específico quando comparado com o diagnóstico da presença viral por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou captura híbrida¹⁵.

Com o presente estudo de casos e controles, visa-se avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (vp+) e negativo (vp-) do anticorpo anti-p16ink^{4a} em citologia cervical, além da factibilidade do uso do anticorpo em lâminas de citologia cervical coletadas de forma convencional.

Método

Estudo de casos e controles desenvolvido em ambulatório de Patologia Cervical localizado na Sede da Gerência Distrital de Saúde 06 do Município de Porto Alegre / RS e conveniado ao Sistema Único de Saúde.

Pacientes suspeitas de lesão precursora ou neoplásica do colo uterino e atendidas nas Unidades de Saúde dos bairros São José, Intercap, Agronomia, Lomba do Pinheiro e Partenon foram encaminhadas ao referido ambulatório após triagem clínica e citológica inicial. Conforme o censo do IBGE (instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) do ano de 2000 residiam na área descrita, 181.095 habitantes, sendo 93.883 mulheres, com renda familiar média variando de 2.60 a 7.54 salários-mínimos regionais³⁷.

As Unidades de Saúde Bananeiras, Esmeralda, Mapa, Morro da Cruz, Murialdo, Panorama, Pequena Casa da Criança, Pitinga, São José, São Pedro e Viçosa foram recrutadas, por meio de cartazes e comunicação direta, ao encaminhamento de casos suspeitos de patologia cervical ao referido ambulatório.

A amostra foi selecionada a partir de dois grupos distintos de pacientes atendidas na sede da Gerência Distrital de Saúde: o primeiro contava com pacientes do Ambulatório de Patologia Cervical que foram recentemente rastreadas nas Unidades de Saúde citadas e,

portanto, suspeitas de lesão cervical; o segundo, contava com pacientes atendidas na própria sede da Gerência Distrital de Saúde, sem rastreamento cervical recente.

Os critérios de inclusão no grupo controle foram a concomitância de citologia cervical negativa (corada pelo método de *Papanicolaou*) para lesão intra-epitelial ou neoplasia invasora, associado a achados colposcópicos normais. Foram considerados casos, as investigações que resultaram em biópsia cervical positiva para lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (NIC 1), alto grau (NIC 2/3) ou câncer cervical (CA).

Foram excluídas aquelas pacientes com hímen íntegro, ausência ou impossibilidade de exposição da cérvix, histórico de conização cervical, gestantes, portadoras de vaginites/cervicites (conforme avaliação clínico-microscópica), incapazes e casos de negativa na participação no estudo.

A **figura 4** apresenta o fluxograma do processo de seleção da amostra a partir do número total de triagens ocorridas (n=287) no período de janeiro de 2004 a julho de 2005.

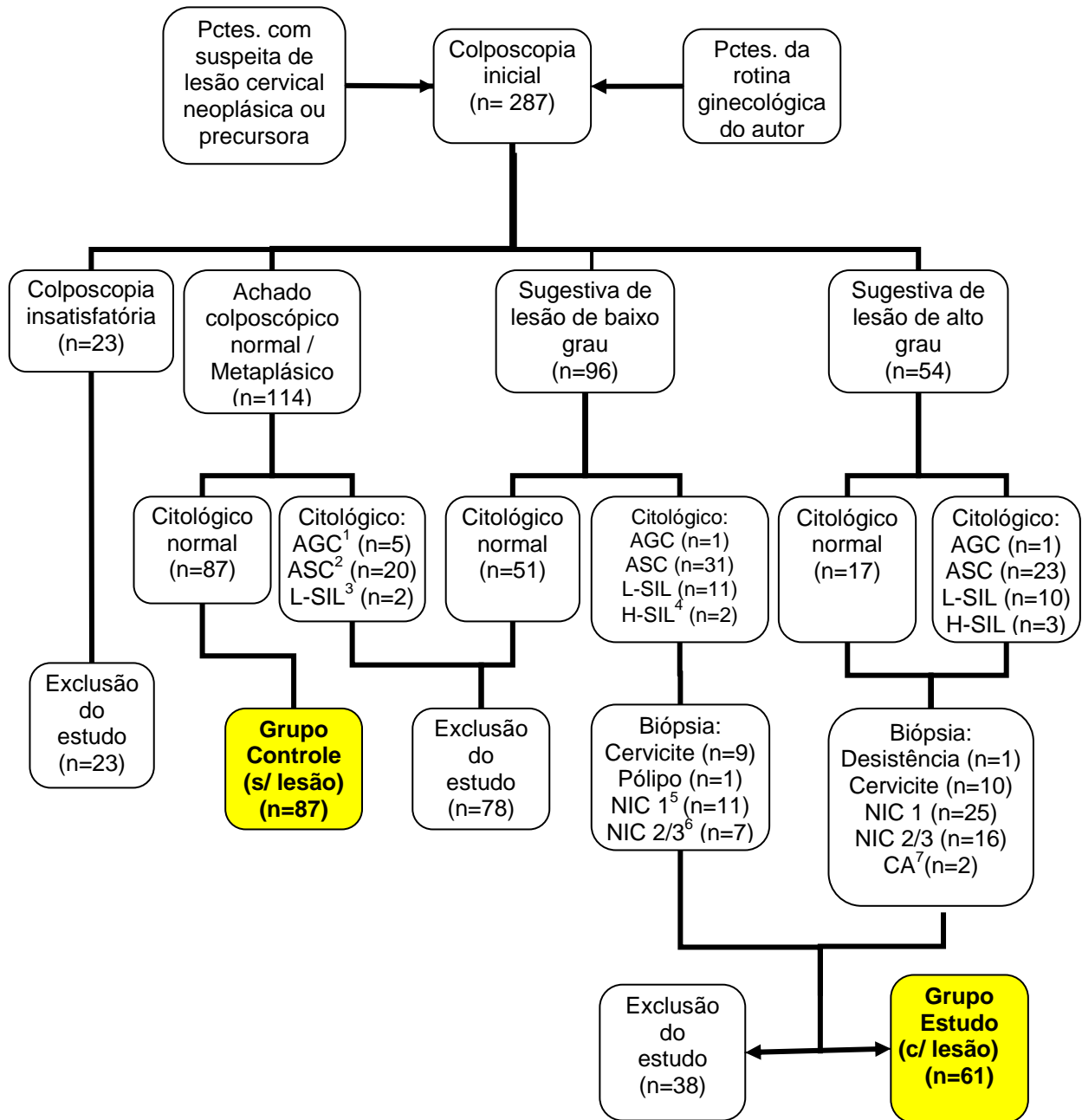


Figura 4: Fluxograma do processo de seleção da amostra

- (1) AGC = Atipia glandular cervical
- (2) ASC = Atipia escamosa cervical
- (3) L-SIL= lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau
- (4) H-SIL = lesão escamosa intra-epitelial de alto grau
- (5) NIC 1 = Neoplasia intra-epitelial cervical grau 1
- (6) NIC2/3 = Neoplasia intra-epitelial cervical grau 2 ou 3
- (7) CA = Carcinoma epidermóide cervical

Durante o período compreendido entre janeiro de 2004 a julho de 2005, foram realizadas duzentas e oitenta e sete triagens citológicas e colposcópicas entre pacientes com e sem suspeita de lesão cervical neoplásica ou precursora.

Pacientes atendidas no Ambulatório de Patologia Cervical ou na rotina ginecológica da Gerência Distrital de Saúde foram convidadas a participar do estudo e apresentadas ao Termo de Consentimento Informado (**anexo 1**). Em concordando na participação, a triagem ocorria a partir do preenchimento de Documento Padrão que abordava as características clínico-epidemiológicas da paciente (**anexo 2**).

Seguiu-se a coleta do exame citológico ICQ (imunocitoquímica) para o teste diagnóstico proposto com anticorpos anti-p16ink^{4a} (clone G175-405 em diluição 1:100 da Pharmingen / BD Biosciences do Brasil). A técnica de imunocitoquímica utilizada foi a Complexo Estreptavidina-Biotina (LSAB) (**anexo 3**).

A próxima etapa contou com a coleta de citologia cervical visando utilização da técnica de coloração preconizada por *Papanicolaou* (**anexo 4**).

Visando a representatividade da junção escamo-colunar e zona de transformação do colo uterino, os exames citológicos foram coletados da forma habitual com a utilização da espátula de Ayre[®] (rotação de 360° na região peri-orifical do colo uterino) e escova cervical tipo *citobrush*[®] (rotação de 90° na endocérvice) individuais e descartáveis³⁸.

Objetivando-se a redução do desprendimento celular durante os processos de “lavagens” na imunocitoquímica, a lâmina utilizada para citologia ICQ contava com camada aderente de 3-aminopropyl(triethoxy)silane^{39, 40}. Tal preparo prévio é rotineiramente preconizado pelo laboratório do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O fixador celular, utilizado em ambas as lâminas, foi o álcool 96% com polietilenoglicol.

A colposcopia foi realizada com equipamento de magnificação de imagem binocular marca DFV[®] com aumento fixo de sete vezes e com soluções habituais: ácido acético a 5%,

solução iodo-iodetada de Schüller e solução fisiológica a 0,9%.

A classificação citológica utilizada para leitura das lâminas convencionais foi a de Bethesda 2001 (**anexo 5**)⁴¹.

A classificação colposcópica utilizada foi a da Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia aprovada em 2002 e recomendada pela Associação Brasileira de Genitoscopia (**anexo 6**).

De acordo com a avaliação citológica convencional e colposcópica inicial foi realizada biópsia diagnóstica do colo uterino que seguiu as indicações consensuais da Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical^{42, 43}:

Citologia compatível com H-SIL e colposcopia satisfatória compatível com lesão de alto grau eram orientadas a biópsia cervical precoce.

Casos de L-SIL, ASC-US, ASC-H, AGC e colposcopia normal ou com alteração metaplásica, foram seguidas em intervalos semestrais e biopsiadas se agravamento do quadro cito-colposcópico. Neste grupo, a presença de colposcopia satisfatória compatível com lesão de baixo ou alto grau, na avaliação inicial, foi seguida de biópsia cervical precoce.

Os casos de colposcopias insatisfatórias foram excluídos do estudo.

As biópsias ocorreram sob anestesia infiltrativa local com lidocaína[®] a 2% sem vasoconstritor e broca tipo *Baliu*[®] com o fragmentos conservados em formalina a 10% e lido sob coloração-padrão de hematoxilina-eosina. O diagnóstico das peças de biópsia seguiu os critérios de Richart, onde foram diagnosticadas como ausência de lesão precursora, lesão histológica intra-epitelial de baixo grau ou NIC 1, lesão histológica intra-epitelial de alto grau ou NIC 2/3 além de carcinoma invasor (CA)^{43, 44} (**anexo 7**).

O critério de positividade das lâminas ICQ foi adaptado dos estudos de Bibbo, Pientong e Saheballi^{3, 45, 46}. A presença de células epiteliais cervicais com positividade amarronada característica em número igual ou superior a 10 no esfregaço, era considerada como lâmina

positiva. Entre estas, discriminou-se três categorias: 1) positividade citoplasmática fraca, 2) positividade citoplasmática forte e 3) positividade nuclear. As lâminas de citologia ICQ foram lidas por dois patologistas independentes e “cegados” para os diagnósticos citológicos convencionais, colposcópicos e histológicos.

Cálculo amostral

O cálculo amostral foi baseado em estudos prévios que abordaram a *performance* do anticorpo anti-p16ink^{4a} em citologia, associado ao exame padrão-ouro cervical ou biópsia diagnóstica corada com hematoxilina e eosina.

Considerando a máxima positividade encontrada entre indivíduos sem lesão em 18% das vezes³², a mínima positividade encontrada entre casos de NIC 1 em 60% das vezes⁴⁷ e mínima positividade encontrada entre casos de NIC 2/3 em 80% das vezes³³, o uso do pacote estatístico PEPI versão 4.0 (*Computer Programs for Epidemiologists*) resultou em tamanho amostral mínimo de 31 casos de lesão de baixo grau, 15 casos de lesão de alto grau, e 46 controles.

Os parâmetros utilizados foram alfa de 95%, beta de 10% (poder do estudo de 90%) com proporção de um controle para cada caso.

Análise estatística

As características clinico-epidemiológicas da amostra foram descritas a partir de variáveis quantitativas (idade, sexarca, número de parceiros sexuais na vida e nos últimos doze meses, escolaridade e gestações) e qualitativas (método contraceptivo utilizado, relato de soropositividade ao vírus da imunodeficiência humana e histórico de doenças sexualmente

transmissíveis, estado pós-menopáusicos e motivo do encaminhamento para investigação).

As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram descritas com médias e desvios-padrão e as com distribuição assimétrica, com medianas e amplitude inter-quartil.

As variáveis categóricas foram descritas com frequências absolutas e porcentagens.

O pacote estatístico SPSS 13.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*) foi utilizado para o cálculo da significância estatística a partir do valor-p.

O teste “t” de *Student* foi usado para variáveis que apresentaram distribuição normal e o teste “U” (*Wilcoxon-Mann-Whitney*) para o cálculo entre aquelas que se distribuíram de forma assimétrica.

Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste chi-quadrado de *Pearson*.

Para o cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo foram utilizadas tabelas de contingência “2 x 2” plotadas no programa de informática *Epi-info 6.0* com intervalos de confiança de 95%. Foi considerado teste diagnóstico positivo aquele em que a citologia ICQ resultou positiva para o anticorpo anti-p16ink^{4a} em núcleo ou citoplasma e teste negativo, a ausência da positividade. Já doença presente foi a investigação que resultou em biópsia cervical positiva para NIC 1, NIC 2/3 ou CA e, doença ausente, a investigação que resultou em citologia convencional negativa e colposcopia com achados normais ou metaplásicos.

Pareceres Éticos

Estudo aprovado pelos comitês de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Prefeitura do Município de Porto Alegre/RS sob pareceres números 04-241 e 001.010889.04.3.

Resultados

O processo de seleção da amostra identificou oitenta e sete pacientes consideradas como livres de lesão cervical precursora ou neoplásica e sessenta e uma pacientes como portadoras de lesão.

A **tabela 1** destaca as principais variáveis sócio-demográficas aferidas pelo investigador durante a amostragem dos casos e controles.

O item “número de parceiros sexuais na vida”, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A mediana foi de três parceiros (2 a 5) no grupo estudo e dois parceiros (1 a 3) no grupo controle.

Avaliando apenas os casos com lesão histológica do colo uterino, a idade média para o diagnóstico de lesão intra-epitelial de baixo grau foi $32,9 \pm 10,9$ anos e entre as lesões de alto grau foi de $26,8 \pm 6,3$ anos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Os casos de carcinoma ocorreram na sexta e sétima décadas de vida e foram da variante epidermóide.

O contraceptivo oral combinado foi o principal método anticoncepcional citado, perfazendo 65,6% (n=40) no grupo estudo e 50,6% (n=44) no grupo controle. Destaca-se a baixa adesão ao uso exclusivo do condom masculino entre 9,8% (n=6) no grupo estudo e 11,5% (n=10) no grupo controle.

O diagnóstico clínico de estado pós-menopáusico (histórico de amenorréia há um ano ou mais associado a sintomas típicos como fogachos, diminuição da libido e dispareunia secundária a alterações atróficas do epitélio vaginal)⁴⁸ ocorreu em 9,8% (n=6) no grupo estudo e 21,8% (n=19) no grupo controle.

O encaminhamento ao ambulatório de patologia cervical foi por exame citológico anormal em 37,8% (n=56) e suspeita clínica de lesão cervical em 25,7% (n=38).

Relato de soropositividade para o vírus da imunodeficiência humana ocorreu em dois casos do grupo estudo e um caso do grupo controle.

Variável	Resultado da Investigação	Sem lesão cervical (n=87)	NIC 1 ⁽²⁾ , NIC 2/3 ⁽³⁾ CA ⁽⁴⁾ (n= 61)	valor-P
Idade em anos		33.8 ± 14.4	30.4 ± 9.7	0.09
Sexarca		16.7± 2.4	16.5 ± 2.5	0.66
Nº parceiros sexuais (na vida)				
	2 ou <	54% (47 casos)	36.1% (22 casos)	
	3 a 5	39.1% (34 casos)	44% (27 casos)	<0.05
	6 ou >	6.9% (6 casos)	19.7% (12 casos)	
Nº parceiros sexuais (nos últimos 12 meses)		1.0 (1-1)	1.0 (1-1)	0.79
Escolaridade (anos de estudo)		8.4 ± 3.0	8.8 ± 2.7	0.42
Gestações		2.0 (1-3)	2.0 (1 - 2.5)	0.73
Histórico de DST ⁽¹⁾		11.5% (10 casos)	9.8% (6 casos)	0.80

Tabela 1: Variáveis sócio-demográficas da amostra de casos e controles (n=148)

- (1) Doença Sexualmente Transmissível
- (2) Lesão intra-epitelial de baixo grau
- (3) Lesão intra-epitelial de alto grau
- (4) Carcinoma epidermóide cervical

A **tabela 2** apresenta os resultados da investigação colposcópica efetuada nas 148 pacientes incluídas no estudo.

Das pacientes com colposcopia sugestiva de lesão de baixo grau (n=96), vinte e oito

foram biopsiadas, sendo diagnosticadas dezoito lesões cervicais além de nove diagnósticos inflamatórios (cervicite crônica) e um caso de pólipos.

Para as pacientes com colposcopia sugestiva de lesão de alto grau (n=54), quarenta e três biópsias resultaram em lesão histológica cervical. Neste grupo, das onze pacientes restantes, dez biópsias resultaram em processo inflamatório crônico (cervicite crônica) e uma paciente não compareceu ao procedimento.

O valor preditivo positivo da colposcopia sugestiva de lesão de alto grau para o encontro de lesão histológica cervical foi de 0.80.

Resultado investigação / Aspecto Colposcópico	Não biopsiado	Cervicite/ pólipos	NIC 1 ⁽¹⁾	NIC 2/3 ⁽²⁾	CA ⁽³⁾ epidermóide	Total
Normal/ metaplásico	87	0	0	0	0	87
Lesão de baixo grau	68	10	11	7	0	96
Lesão de alto grau	1	10	25	16	2	54

Tabela 2: Resultados da colposcopia de acordo com o diagnóstico histológico cervical (n=148)

- (1) Lesão intra-epitelial de baixo grau
- (2) Lesão intra-epitelial de alto grau
- (3) CA = Carcinoma

A descrição dos achados citológicos com o anticorpo anti-p16ink^{4a} entre os dois patologistas nos diferentes diagnósticos histológicos encontra-se na **tabela 3** e exemplos de positividade ao anticorpo na **figura 6**.

Verifica-se que a positividade para o anticorpo foi menos frequente entre as pacientes sem lesão e alta entre aquelas com lesão histológica do colo.

Ressalta-se que a positividade citológica nuclear foi encontrada somente entre casos de

NIC 2/3 e a positividade citológica citoplasmática forte somente entre pacientes com lesão histológica do colo (NIC 1 e NIC 2/3).

Os dois casos de CA epidermóide apresentaram positividade citoplasmática forte entre os dois patologistas.

Entre aquelas com ausência de lesão histológica do colo, o anticorpo teve, no máximo, positividade fraca citoplasmática e em pequena porcentagem de pacientes.

A variação inter-observador (índice de kappa), encontrada para a citologia com o anticorpo, foi de 0.65 quando avaliados os dados de forma global (sem positividade, positividade fraca e forte citoplasmática além da nuclear).

Quando avaliados os dados de forma pormenorizada excluindo-se o critério subjetivo (forte ou fraco) da positividade citoplasmática e mantendo apenas três grupos (sem positividade, positividade citoplasmática e positividade nuclear), o índice Kappa foi de 0,74.

Quando avaliada a diferença percentual entre os patologistas, verificam-se escores inferiores a 5% nos grupos extremos da investigação: NIC 2/3 associada à positividade nuclear citológica para o anticorpo e ausência de lesão cervical associada à negatividade citológica para o anticorpo .

Nos casos de pacientes portadoras de NIC 2/3, a leitura das lâminas ICQ apresenta baixa variação inter-observador, quando há positividade citológica nuclear (diferença percentual de 4.3%). Quando há ausência de lesão cervical e ausência de positividade citológica para o anticorpo, a variação inter-observador é de 4.6%. Já entre as portadoras de NIC 1, há importante variação inter-observador.

Resultado da investigação	Sem lesão (n=87)		NIC 1 ⁽¹⁾ (n=36)		NIC 2/3 ⁽²⁾ (n=23)		CA ⁽³⁾ (n=2)	
	P1 ⁽⁴⁾	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
citologia ICQ ⁽⁵⁾ (anti-p16ink ^{4a})								
Ausência positividade	77 (88.5%)	73 (83.9%)	8 (22.2%)	15 (41.7%)	0	1 (4.3%)	0	0
Positivo citoplasma (fraco)	10 (11.5%)	14 (16.1%)	28 (77.8%)	14 (38.9%)	3 (13%)	7 (30.4%)	0	0
Positivo citoplasma (forte)	0	0	0	7 (19.4%)	13 (56.5%)	9 (39.1%)	2 (100%)	2 (100%)
Positivo nuclear	0	0	0	0	7 (30.4%)	6 (26.1%)	0	0

Tabela 3: Expressão do anticorpo anti-p16ink ^{4a} em citologia cervical (n=148)

- (1) Lesão intra-epitelial de baixo grau
- (2) Lesão intra-epitelial de alto grau
- (3) Carcinoma epidermóide
- (4) P1 = patologista 1, P2 = patologista 2
- (5) Imuno-citoquímica

A representação gráfica da *performance* do anticorpo na citologia cervical encontra-se na **figura 5**. O resultado da investigação está dicotomizado entre sem lesão cervical (citologia *Papanicolaou* negativa e colposcopia com achados normais) e com lesão histológica cervical (biópsia diagnóstica do colo com NIC 1, NIC 2, NIC 3 ou carcinoma invasor).

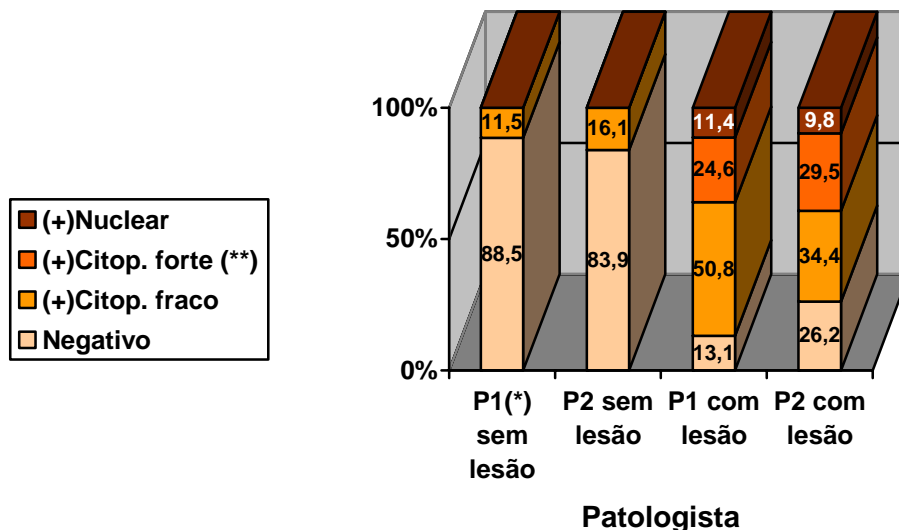


Figura 5: *Performance* do anticorpo anti-p16ink^{4a} na citologia cervical de acordo com o resultado da investigação e por patologista

(*) P1 = patologista 1, P2 = patologista 2

(**) (+)Citop. = Positividade ao anticorpo anti-p16ink^{4a} em citoplasma

A *performance* do anticorpo, na citologia cervical, quanto à sensibilidade e especificidade encontra-se na **tabela 4**, estando os dados apresentados de acordo com o diagnóstico histológico e por patologista.

Destaca-se a maior sensibilidade do teste diagnóstico entre os casos de lesão precursora de alto grau e carcinoma. Nestes grupos há baixa variação inter-observador na leitura das lâminas de citologia entre os patologistas.

Já entre os casos de lesão precursora de baixo grau, há menor sensibilidade e maior variação inter-observador.

Histopatologia	NIC 1 ⁽¹⁾ (n=36)		NIC 2/3 ⁽²⁾ (n=23)		NIC 1 + NIC 2/3 (n=59)		CA ⁽³⁾ (n=2)	
	P1 ⁽⁴⁾	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
Medida (IC 95%)								
Sensibilidade	77.8% (60.4–89.3)	58.3% (40.9–74.0)	100.0% (82.2–100)	95.7% (76.0–99.8)	86.4% (74.5–93.6)	72.9% (59.5–83.3)	100.0% (19.8–100)	100.0% (19.8–100)
Especificidade	88.5% (79.4–94.1)	83.9% (74.1–90.6)	88.5% (79.4–94.1)	83.9% (74.1–90.6)	88.5% (79.4–94.1)	83.9% (74.1–90.6)	88.5% (79.4–94.1)	83.9% (74.1–90.6)

Tabela 4: Citologia cervical com o anticorpo anti-p16ink^{4a}: sensibilidade e especificidade

(1) NIC 1 = Lesão intra-epitelial de baixo grau

(2) NIC 2/3 = Lesão intra-epitelial de alto grau

(3) CA = Carcinoma epidermóide cervical

(4) P1= Patologista 1, P2 = Patologista 2

A *performance* do anticorpo, na citologia cervical, quanto aos valores preditivos positivo e negativo encontra-se na **tabela 5**, estando os dados apresentados de acordo com o diagnóstico histológico e por patologista. Para a probabilidade de lesão do colo uterino após o teste citológico positivo ou ausência de lesão do colo após o teste negativo, o grupo estudo foi dividido em NIC 1 ou pior (NIC 1 + NIC 2 + NIC 3 + carcinoma), NIC 2 ou pior (NIC 2 + NIC 3 + carcinoma) e, por fim, o grupo carcinoma. Destacam-se os elevados valores preditivos negativos do teste diagnóstico com o anticorpo proposto, fato indispensável para testes diagnósticos de rastreio populacional.

Histopatologia	NIC 1 ou > ⁽¹⁾ (n=61)		NIC 2 ou > ⁽²⁾ (n=25)		CA ⁽³⁾ (n=2)	
	P1 ⁽⁴⁾	P2	P1	P2	P1	P2
Medida (IC 95%)						
Valor preditivo positivo	84.1% (72.3 – 91.7)	76.3% (63.1 – 86.0)	39.7% (27.8 – 52.8)	40.7% (28.3 – 54.2)	3.2% (0.6 - 12)	3.4% (0.6 – 12.7)
Valor preditivo negativo	90.6% (81.8 – 95.6)	82% (72.1 – 89.1)	100% (94.6 - 100)	98.9% (93 – 99.9)	100% (94.6 - 100)	100% (94.8 - 100)

Tabela 5: Citologia cervical com o anticorpo anti-p16ink^{4a}: valor preditivo positivo e negativo

- (1) NIC 1 + NIC 2 + NIC 3 + Carcinoma
- (2) NIC 2 + NIC 3 + Carcinoma
- (3) CA = Carcinoma epidermóide cervical
- (4) P1= Patologista 1, P2 = Patologista 2

A descrição dos achados conjuntos das citologias convencional e ICQ, de acordo com os resultados histológicos, são representadas na **tabela 6**.

Aqui, a citologia ICQ foi dicotomizada entre negativa e positiva (positividade fraca e forte citoplasmática além da positividade nuclear). A citologia convencional foi agrupada em quatro categorias: normal (negativa e atrofia), atipia (ASC-US, ASC-H e AGC), L-SIL ou H-SIL.

Pela observação da tabela, verifica-se que, quando a citologia convencional era negativa, o uso do teste diagnóstico com o anticorpo “auxiliou” para o diagnóstico de cinco NIC 2/3 e um CA epidermóide conforme o patologista um e quatro NIC 2/3 e um CA epidermóide conforme o patologista dois.

Para os casos de NIC 1, o uso do teste diagnóstico com o anticorpo “auxiliou” em dez casos entre os dois patologistas.

No grupo atipia da citologia convencional, o uso do anticorpo identificou oito NIC 2/3 e um caso de CA epidermóide entre os dois patologistas.

Citologia	Resultado da investigação	Sem lesão cervical (n=87)		NIC 1 ⁽¹⁾ (n=36)		NIC 2/3 ⁽²⁾ (n=23)		CA ⁽³⁾ epidermóide (n= 2)	
		P 1 ⁽⁵⁾	P 2	P 1	P 2	P 1	P 2	P 1	P 2
convencional <i>Papanicolaou</i>	ICQ ⁽⁴⁾ anti-p16ink ^{4a}								
Negativo	-	62	58	4	4	0	1	0	0
	+	4	8	10	10	5	4	1	1
Atipia	-	14	14	2	6	0	0	0	0
	+	5	5	12	8	8	8	1	1
L-SIL	-	1	1	2	5	0	0	0	0
	+	0	0	6	3	6	6	0	0
H-SIL	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	1	1	0	0	4	4	0	0

Tabela 6: Resultado conjunto entre as citologias cervicais *Papanicolaou* e ICQ (imuno-citoquímica) com o anticorpo anti-p16ink^{4a}

- (1) NIC 1 = Lesão intra-epitelial de baixo grau
- (2) NIC 2/3 = Lesão intra-epitelial de alto grau
- (3) CA = Carcinoma
- (4) Imuno-citoquímica
- (5) Patologista 1 e Patologista 2

Baseados nos dados apresentados na tabela 6 foram recalculadas a sensibilidade e a especificidade utilizando-se os dois métodos diagnósticos em conjunto.

Neste caso, foi considerado como teste negativo somente aqueles que contavam com

citologia convencional negativa associada à citologia ICQ também negativo. Foi considerado teste positivo, todos os demais, ou seja, citologia convencional com atipia, L-SIL ou H-SIL ou citologia ICQ, contando com qualquer grau de positividade, citoplasmática ou nuclear.

Os dados encontram-se na **tabela 7**, destacando o incremento na sensibilidade na associação dos dois métodos diagnósticos em conjunto, citologia convencional *Papanicolaou* e citologia ICQ com anticorpos anti-p16ink^{4a}.

Histopatologia Medida (IC 95%)	NIC 1 ⁽¹⁾ (n=36)		NIC 2/3 ⁽²⁾ (n=23)		NIC 1 + NIC 2/3 (n=59)		CA ⁽³⁾ Epidermóide (n=2)	
	P ⁽⁴⁾ 1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
Sensibilidade	88.9% (73.0-96.4)	88.9% (73.0-96.4)	100% (82.2-100)	95.7% (76.0-99.8)	93.2% (82.7-97.8)	91.5% (80.6-96.8)	100.0% (19.8-100.0)	100% (19.8-100)
Especificidade	71.3% (60.4-80.2)	66.7% (55.7-76.2)	71.3% (55.7-76.2)	66.7% (55.7-76.2)	71.3% (60.4-80.2)	66.7% (55.7-76.2)	71.3% (60.4-80.2)	66.7% (55.7-76.2)

Tabela 7: Associação das citologias convencional e ICQ (imuno-citoquímica) para o diagnóstico de lesões cervicais

- (1) NIC 1 = Lesão intra-epitelial de baixo grau
- (2) NIC 2/3 = Lesão intra-epitelial de alto grau
- (3) CA = Carcinoma
- (4) Patologista

Discussão

No presente estudo, a sensibilidade e o valor preditivo negativo do método diagnóstico utilizado mostraram adequado desempenho entre casos de NIC 2/3 e CA. Tais resultados reproduzem os achados da literatura que abordaram a citologia cervical com o anticorpo proposto^{32-34, 47}:

- Entre portadoras de lesão precursoras da cérvix, quando avaliadas em conjunto (NIC 1 + NIC 2/3), o estudo reproduz os achados da literatura com sensibilidades variando entre 75.4%³⁴ até 92.3%⁴⁷.
- Entre casos de NIC 1, a sensibilidade do teste diagnóstico foi 77.8% e 58.3% entre os patologistas um e dois respectivamente, acompanhando parcialmente os achados da literatura onde há variação de 54.3%³⁴ até 74.1%³².
- Estudo de Pientong e cols, publicado em 2003, encontrou sensibilidade de 33% entre casos de NIC 1, entretanto, foi estudo com limitações metodológicas, onde as coletas ocorreram apenas com espátula de Ayre, a diluição do anticorpo foi de 1:400 e não houve confirmação histológica dos casos³.

Entre casos de positividade citoplasmática forte ou positividade nuclear, aqui verificada principalmente entre NIC 2/3 ou CA epidermóide, reproduz os achados da literatura. Quando a positividade ao anticorpo foi avaliada de forma distinta entre citoplasma e núcleo, os achados de Saqi e cols foram: sensibilidade de 90% entre NIC 2/3 e 100% entre lesões invasoras³². Já Bibbo e cols, encontraram sensibilidade de 94.4% entre casos de NIC 2/3³³.

Quanto à variação inter-observador, utilizando a metodologia proposta pelo estudo (ausência de positividade, positividade citoplasmática fraca, forte e positividade nuclear), há elevada concordância entre casos de NIC 2/3 e teste diagnóstico positivo nuclear. Da mesma forma, há elevada concordância entre a ausência de lesão e teste diagnóstico negativo, além da positividade citoplasmática forte entre os dois casos de lesão invasora. Nestes extremos, a diferença percentual entre os patologistas foi inferior a 5%.

Já entre casos de NIC 1 e, principalmente utilizando o critério subjetivo da avaliação citoplasmática, houve importante variação inter-observador. O índice kappa do estudo alcançou 0.74 apenas quando o critério subjetivo da avaliação citoplasmática foi afastado. Tais resultados são reproduzidos em recente estudo de Negri e cols⁴⁷, publicado em 2006 que encontrou sensibilidade de 66.6% entre casos de NIC 1 e índice kappa de 0.77. Destaca-se a exigüidade da amostra utilizada pelo pesquisador citado, que contou com seis casos de NIC 1.

Entre os dois casos de CA epidermóide, ocorridos na sexta e sétima décadas de vida, portanto em estado hipoestrínico, a positividade encontrada foi no citoplasma entre os dois patologistas. Este achado é previsível pela literatura médica, pois o anticorpo proposto não reage com células degeneradas inclusive de origem neoplásica³. Provavelmente a positividade verificada referia-se a tecidos circunjacentes à lesão Invasora, estando estes ainda em estado precursor.

Quanto aos valores preditivos encontrados no estudo, destaca-se que a ausência de lesão após o teste diagnóstico negativo ou valor preditivo negativo, variou de 82% (NIC1 ou >) a 100% (NIC 2 ou >). Para testes diagnósticos de rastreio populacional é medida indispensável, visto que testes com alto valor preditivo negativo serão seguros no diagnóstico da ausência de doença em curso. No estudo de Trunk e cols¹⁷, o valor

preditivo negativo foi superior a 90% tanto entre casos de NIC 1 (ou superior) quanto em NIC 2 (ou superior). Já Saqi e cols³², encontraram valores preditivos negativos de 74,2% entre casos de NIC 1 (ou superior) e 96,8% entre casos de NIC 2 (ou superior).

A utilização dos achados conjuntos das citologias convencional e ICQ foi proposta com o objetivo da elucidação de casos falso-negativos da primeira:

- Verifica-se que os dois casos de carcinoma epidermóide encontravam-se entre citologias convencionais diagnosticadas como normais ou com alterações atípicas de origem escamosa / glandular.
- No mesmo grupo (citologias convencionais diagnosticadas como normais ou atípicas escamosas / glandulares) também se encontravam treze NIC 2/3 conforme o patologista um e doze NIC 2/3 conforme o patologista dois.
- Em comum, todos estes casos possuíam positividade para o anticorpo anti-p16ink^{4a}.
- Em recente revisão da literatura, não se encontra associação semelhante para comparações.

O presente estudo não avaliou a presença do HPV na amostra selecionada, que colaboraria para a elucidação de casos duvidosos:

- A positividade citoplasmática encontrada entre 10 e 14 pacientes sem lesão cervical conforme o patologista um e dois respectivamente;
- Os casos de NIC 1 que se apresentaram com maior discordância entre os observadores e associado à sensibilidade inferior do método.

Importante destacar que, contrariamente ao citado na literatura médica, o uso do anticorpo anti-p16ink^{4a} não apresentou dificuldades de difusão no esfregaço, citado

como limitador entre estudos que não empregaram a citologia de meio líquido³⁶. Ou seja, o anticorpo anti-p16ink^{4a} foi considerado, pelos autores, como teste factível para o rastreamento de lesões cervicais precursoras ou neoplásicas.

Figura 6 : Exemplos de positividade ao anticorpo anti-p16ink^{4a}



Figura 6A: Citologia cervical em médio aumento com célula positiva para o anticorpo anti-p16ink^{4a}



Figura 6B: Citologia cervical em grande aumento com positividade citoplasmática para o anti-p16ink^{4a} em célula epitelial cervical com macronucleose.



Figura 6C: Citologia cervical em grande aumento com grupamento celular positivo para o anti-p16ink^{4a} e discariose



Figura 6D: Citologia cervical em médio aumento com célula epitelial positiva para o anti-p16ink^{4a}



Figura 6E: Citologia cervical em grande aumento com célula epitelial positiva para o anti-p16ink^{4a} e discariose.

Bibliografia:

1. Sawaya GF. Papanicolaou testing: when does more become less? *Am J Med* 2005; 118(2):159-160.
2. Felix JC, Amezcua C. In vitro adjuncts to the pap smear. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002; 29(4):685-99, vii.
3. Pientong C, Ekalaksananan T, Swadpanich U et al. Immunocytochemical detection of p16INK4a protein in scraped cervical cells. *Acta Cytol* 2003; 47(4):616-623.
4. Nanda K, McCrory DC, Myers ER et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review *Ann Intern Med* 2000; 132(10):810-819.
5. Schneider V, Henry MR, Jimenez-Ayala M, Turnbull LS, Wright TC. Cervical cancer screening, screening errors and reporting. *Acta Cytol* 2001; 45(4):493-498.
6. Bergeron C, Debaque H, Ayivi J, Amaizo S, Fagnani F. Cervical smear histories of 585 women with biopsy-proven carcinoma in situ. *Acta Cytol* 1997; 41(6):1676-1680.
7. Sato S, Mikino H, Matsunaga G, Yajima A. False negative rate in mass screening for cervical cancer. *Acta Cytol* 1998; 42(3):836-837.
8. Cohn DE, Herzog TJ. New innovations in cervical cancer screening. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44(3):538-549.
9. Ienbach-Hellweg G, Trunk MJ, von Knebel DM. Traditional and new molecular methods for early detection of cervical cancer. *Arch Pathol* 2004; 66(5):35-39.
10. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide *J Pathol* 1999; 189(1):12-19.
11. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19(1-2):1-5.
12. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(8):930-934.
13. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(4):244-265.
14. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2001; 8(2):83-92.
15. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(7):884-891.

16. Stanley MA. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. *Virus Res* 2002; 89(2):241-248.
17. Trunk MJ, Ienbach-Hellweg G, Ridder R et al. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol* 2004; 48(6):771-782.
18. Lin WM, Ashfaq R, Michalopoulos EA, Maitra A, Gazdar AF, Muller CY. Molecular Papanicolaou tests in the twenty-first century: molecular analyses with fluid-based Papanicolaou technology
Am J Obstet Gynecol 2000; 183(1):39-45.
19. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7):2407-2414.
20. Murphy N, Ring M, Heffron CC et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58(5):525-534.
21. Tringler B, Gup CJ, Singh M et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2004; 35(6):689-696.
22. Wang JL, Zheng BY, Li XD et al. p16INK4A and p14ARF expression pattern by immunohistochemistry in human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Mod Pathol* 2005; 18(5):629-637.
23. Negri G, Vittadello F, Romano F et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004; 445(6):616-620.
24. Murphy N, Heffron CC, King B et al. p16INK4A positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. *Virchows Arch* 2004; 445(6):610-615.
25. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Fu E. Expression of p16INK4A in Pap smears containing atypical glandular cells from the uterine cervix. *Acta Cytol* 2004; 48(2):173-180.
26. Zielinski GD, Sniijders PJ, Rozendaal L et al. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. *J Pathol* 2003; 201(4):535-543.
27. Ishikawa M, Fujii T, Masumoto N et al. Correlation of p16INK4A overexpression with human papillomavirus infection in cervical adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(4):378-385.
28. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its

- precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(2):187-193.
29. Murphy N, Ring M, Killalea AG et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003; 56(1):56-63.
 30. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16(7):665-673.
 31. Klaes R, Benner A, Friedrich T et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(11):1389-1399.
 32. Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P. Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (SurePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002; 27(6):365-370.
 33. Bibbo M, DeCecco J, Kovatich AJ. p16INK4A as an adjunct test in liquid-based cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 2003; 25(1):8-11.
 34. Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B et al. Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol* 2004; 31(4):235-242.
 35. Ichinose H. p16INK4a IHC in the diagnosis of cervical CIN. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(9):1284.
 36. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92(2):276-284.
 37. Prefeitura Municipal de Porto Alegre - Bairros Oficiais. Secretaria do Planejamento Municipal - Porto Alegre RS Brasil . 10-7-2004.
Ref Type: Internet Communication
 38. Luzzatto R, Boon ME. Contribution of the endocervical Cytobrush sample to the diagnosis of cervical lesions. *Acta Cytol* 1996; 40(6):1143-1147.
 39. Dyanov HM, Dzitoeva SG. Method for attachment of microscopic preparations on glass for in situ hybridization, PRINS and in situ PCR studies. *Biotechniques* 1995; 18(5):822-4, 826.
 40. Taylor S, Smith S, Windle B, Guiseppi-Elie A. Impact of surface chemistry and blocking strategies on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(16):e87.
 41. Solomon D, Davey D, Kurman R et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287(16):2114-2119.

42. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; 287(16):2120-2129.
43. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Carlson J, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(1):295-304.
44. Crum CP. Symposium part 1: Should the Bethesda System terminology be used in diagnostic surgical pathology?: Point. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(1):5-12.
45. Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 2002; 46(1):25-29.
46. Sahebali S, Depuydt CE, Segers K et al. p16INK4a as an adjunct marker in liquid-based cervical cytology. *Int J Cancer* 2004; 108(6):871-876.
47. Negri G, Moretto G, Menia E et al. Immunocytochemistry of p16INK4a in liquid-based cervicovaginal specimens with modified Papanicolaou counterstaining. *J Clin Pathol* 2006; 59(8):827-830.
48. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of menopause. *Endocr Pract* 2006; 12(3):315-337.

Conclusões

Respondendo aos objetivos propostos nesta pesquisa:

- O anticorpo anti-p16ink^{4a}, avaliado quanto a sua expressão em citologia cervical, revelou-se adequado para o estudo proposto. Não foi verificado inadequação para difusão do anticorpo nas lâminas de citologia cervical coletadas da forma convencional (não-meio líquido).
- O uso do anticorpo em citologia cervical permitiu a elucidação de casos falso-negativos rastreados pela citologia *Papanicolaou*.
- Obteve adequada sensibilidade e valor preditivo negativo principalmente entre lesões intra-epiteliais de alto grau e carcinomas epidermóides cervicais, seguindo os achados da literatura médica.
- Verificou-se menor sensibilidade quando utilizado entre casos de NIC 1.
- Quanto à variação inter-observador na leitura das lâminas, o uso do anticorpo proposto apresentou-se com adequado índice kappa principalmente entre as lesões intra-epiteliais de alto grau e carcinomas epidermóides cervicais.

Considerações finais e perspectivas

O presente estudo abordou uma lacuna da literatura médica quanto ao uso do anticorpo anti-p16ink^{4a}. Citologia cervical coletada de forma convencional e a confirmação dos achados a partir do exame *padrão-ouro*: biópsia diagnóstica dirigida pela colposcopia.

A grande dificuldade logística em realizar rastreamento populacional para o câncer cervical, associada à carência de recursos públicos e a baixa adesão às campanhas governamentais, deverá motivar os pesquisadores nos estudos futuros.

Vislumbramos a auto-coleta domiciliar do exame de rastreamento cervical e a sua interpretação utilizando métodos de alta sensibilidade e especificidade, como o futuro para o diagnóstico das lesões precursoras ou invasoras do colo uterino.

Os autores desejam que este estudo sirva de estímulo para a reflexão dos objetivos desejados por todos: Diagnóstico precoce das lesões precursoras cervicais, tratamento não mutilador e, finalmente, redução da mortalidade entre os casos de neoplasia cervical.

O presente trabalho foi exposto na forma de *Pôster* no II Simpósio Regional de Genitoscopia, com resultados preliminares, nos dias 25 a 29 de outubro de 2006.

Recebeu titulação de Menção Honrosa na Classificação Geral dos Painéis pela abordagem inovadora no rastreamento cervical utilizando citologia convencional.

Com a grande base de dados obtida, a partir da amostragem de duzentas e oitenta e sete pacientes, e os resultados promissores encontrados, duas novas publicações estão previstas:

1. “Anticorpo anti-p16ink^{4a} em Atipias Escamosas de Significado Indeterminado (ASC-US)”
2. “Variação inter-observador em biópsias cervicais coradas com o anticorpo anti-p16ink^{4a}”

Anexo A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Consentimento Informado

Título do Projeto: Pesquisa do Anticorpo anti-p16ink^{4a} em Citologia Cervical
Investigador: Alexandre Rocha – Médico Ginecologista e Obstetra da Secretaria da Saúde do Município de Porto Alegre, Matrícula 77373-9 e CRM 21858, aluno da pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
Orientadoras: Prof. Dra. Maria Isabel Edelweiss e Prof. Dra. Mary Clarisse Bozzetti.

Eu, _____ fui informada dos objetivos da pesquisa acima identificada de maneira clara e detalhada. Recebi informações a respeito da minha inclusão na referida e esclareci minhas dúvidas. Fui informada que, a qualquer momento, poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão. O investigador Dr. Alexandre Rocha CRM 21858 – médico Ginecologista e Obstetra certificou-me que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais, bem como o seguimento de minha doença cervical (colo uterino), se presente, não sofrerá alteração pela minha inclusão ou exclusão no grupo estudo ou grupo controle.

Justificativa do estudo: Melhorar a capacidade de detecção das alterações cervicais (colo uterino) a partir do exame “preventivo” ou citopatológico;

Procedimento utilizado: Coleta do exame “preventivo” do colo uterino da forma tradicional que envolve uma “raspagem” da região cervical, utilizando espátula de madeira e escova tipo cytobrush individuais e descartáveis; Para tanto será utilizado espéculo vaginal. O material assim obtido será encaminhado a laboratório para avaliação microscópica. Casos especiais de suspeita de lesões no colo uterino será indicado a realização de biópsia local que consta de retirada, por meio de cirurgia (de pequeno porte com broca tipo “Baliu”), de um fragmento do colo uterino que medirá aproximadamente 0,4cm de diâmetro (menos da metade de um centímetro) com o objetivo de diagnóstico da lesão suspeita. Tal procedimento se efetuará sob anestesia local com lidocaína a 2% infiltrativa sem vasoconstritor.

Riscos dos procedimentos: Poderá haver desconforto momentâneo pelo uso do espéculo vaginal. A coleta do citopatológico (“preventivo”), poderá ocasionar sangramento no local de “raspagem”. A retirada do fragmento de biópsia poderá ocasionar dor local e sangramento após a realização do procedimento, geralmente de pequena monta e revertidos com analgesia (remédios para dor) e compressão local (bucha de gazes estéreis no fundo vaginal para evitar sangramento no local de biópsia). Não há evidências na literatura médica atual de riscos a longo prazo com estes procedimentos, tipo: infertilidade (dificuldade em engravidar), aumento no número de abortos (“perdas” de gravidez no futuro), dispareunia (dor nas relações sexuais), diminuição da libido (diminuição da vontade de manter relações sexuais).

Benefícios esperados: Reavaliar o exame “preventivo” com uma substância corante especial (marcador) durante a interpretação no laboratório e definir sua possível utilização rotineira no futuro; com a biópsia do colo uterino (fragmento), temos o exame “de certeza” para a presença ou não de lesões malignas ou pré-malignas do colo uterino.

Métodos alternativos existentes: Não há na literatura médica atual, método eficaz para melhorar a resolução do exame “preventivo”, as técnicas atualmente sugeridas são de

caráter experimental. Não há substituto para as biópsias do colo uterino quanto ao diagnóstico “de certeza” das lesões.

Formas de acompanhamento: As pacientes serão seguidas por demanda espontânea (volta à unidade voluntariamente conforme orientado) ou busca ativa (chamamento da paciente a unidade) principalmente quando suspeita de doença no colo do útero);

Compensação Financeira: Não haverá nenhum tipo de pagamento às mulheres que concordarem em participar do estudo.

Custos para paciente: Não haverá custo monetário para as participantes do estudo. Todos os materiais utilizados estão discriminados no protocolo do estudo e foram quitados pelo patrocinador.

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo: Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que estamos propondo e convidando as mulheres a participar; no entanto, se houver alguma dúvida, estas serão esclarecidas diretamente pelo investigador, Dr. Alexandre Rocha pelo telefone 33363284 e pela pesquisadora responsável, Dra. Maria Isabel Edelweiss pelo telefone 21018000 ramal 8013 ou 8334.

Em casos de danos à paciente: Se a participante do estudo acha que teve algum problema de saúde relacionado com a sua participação, deverá contatar o investigador, Dr. Alexandre Rocha pelo telefone 33363284.

Recebi segunda via assinada, de igual teor desta, no dia de hoje.

Assinatura da paciente

Assinatura do investigador
Carimbo

Porto Alegre, _____ de _____ de 20 ____

Anexo B: Documento de Inclusão no Estudo:

Documento de Inclusão
Anticorpo anti-P16ink^{4a} em citologia cervical

Nome _____ DN ____/____/____
Endereço _____ Bairro _____

Sexarca _____ anos, DSTs no Passado: não, sim qual _____

Gesta ____/Parto ____/Aborto ____/Cesariana _____

Menopausada: não, sim, terapia de reposição hormonal? _____

Método contraceptivo Atual _____,

Escolaridade _____

No de parceiros sexuais na vida: _____, nos últimos 12 meses _____

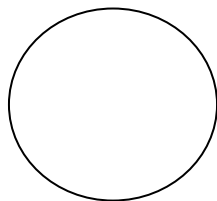
Tabagismo: não, sim, quantos/dia _____

Motivo do encaminhamento _____

Último CP do colo uterino _____, data ____/____/____

Outros: _____

1) Colposcopia em ____/____/____



2) Coleta do Citopatológico em ____/____/____

Lâmina de citopatológico *Papanicolaou* número _____

Diagnóstico _____

Lâmina de citopatológico *ICQ* número _____

Diagnóstico patologista 1 _____

Diagnóstico patologista 2 _____

3) Exame Histológico do colo uterino em ____/____/____

Diagnóstico _____

Anexo C: Técnica LSAB para Imunocitoquímica:

- 1) Lâminas coletadas com preparo prévio de aminopropil-triethoxy-silane (*Sigma Chemical Corporation*);
- 2) Amostra submetida à rehidratação com álcool etílico absoluto (quatro banhos) e lavagem com solução salina tamponada (SST) em pH 7,4 por cinco minutos;
- 3) Recuperação de epítomos pelo calor úmido (SST de citrato em pH 6,4 por três minutos em forno de microondas);
- 4) Bloqueio de reações inespecíficas com leite desnatado diluído em água destilada;
- 5) Tratamento com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em SST por cinco minutos, para bloqueio da peroxidase endógena;
- 6) Incubação com o anticorpo monoclonal anti-p16ink^{4a} clone G175-405 fornecido pela *Pharmingen / BD Biosciences* do Brasil diluição 1:100, por tres horas;
- 7) Incubação por trinta minutos com complexo ligação-imunoglobulinas biotinizadas anti-coelho, anti-camundongo e anti-carneiro pré-diluídas em SST;
- 8) Incubação por trinta minutos com complexo estreptavidina peroxidase;
- 9) Tratamento das lâminas para visualização da reação com solução 3,3-tetra-hidroclorato de diaminobenzidina (DAB) na concentração de 1mg/ml em SST de citrato e solução de H₂O₂ a 5% por duas vezes de 20 minutos. As lâminas são contra-coradas com hematoxilina de Harris por 20 segundos;
- 10) Desidratação com banhos de álcool etílico absoluto (cinco banhos) e xilol (3 banhos);
- 11) Montagem das lâminas com bálsamo e lamínula;

(*) Todos os passos da reação ICQ são realizados à temperatura ambiente com exceção da etapa de recuperação antigênica, realizada em forno de microondas. Entre cada passo da reação, antes do uso do DAB, as lâminas são lavadas varias vezes com SST (pH 7,4) e, após o uso do DAB, as lavagens são feitas com água comum.

(*) Controle positivo para o anticorpo anti-p16ink^{4a}: Peça de histologia de carcinoma cervical sabidamente positivo para o anticorpo . Controle negativo: Mesma lâmina anterior sem a incubação do anticorpo primário.

Anexo D: Técnica de Papanicolaou

1. Hidratação: Deslocamento gradual do álcool de fixação no esfregaço pelo uso de álcool em solução diluída a 80%, 70% e 50% em água destilada, seis a oito mergulhos.
2. Coloração nuclear: Hematoxilina de Harris não acidificada por seis minutos (corante com afinidade pela cromatina), pelo método regressivo
3. Remoção do excesso de hematoxilina com ácido hidroclórico
4. Desidratação: Etanol 50% até 95% em quatro banhos
5. Coloração citoplasmática com contra-corantes: utilizar o Orange G (corante da queratina na cor laranja) seguindo-se do EA36 (cora o citoplasma de células metabolicamente ativas).
6. Clareamento: xilol que resultará na transparência celular
7. Montagem: Bálsamo do Canadá

Anexo E: Classificação Citológica de Bethesda 2001

1) **Tipo da amostra:** convencional, meio líquido.

2) **Avaliação da amostra:**

2.1) **Satisfatória:** com representação da zona de transformação, sem representação da zona de transformação, parcialmente obscurecida por sangue ou inflamação, artefatos.

2.2) **Não satisfatória:** rejeitada, não processada por (...); processada e examinada, não satisfatória por (...)

3) **Negativa para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna:** Alterações celulares reativas associadas a inflamação, radiação DIU e outras; microorganismos tipo tricomonas, fungos, sugestivo de vaginose bacteriana, actinomyces, alterações sugestivas do herpes simplex; atrofia; células glandulares pós-histerectomia

4) **Anomalias em células epiteliais:**

4.1) Anomalias em células pavimentosas: células pavimentosas atípicas de significado indeterminado (asc-us), células pavimentosas atípicas não se podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (asc-h), lesão intraepitelial de baixo grau l-Sil (inclui: HPV, displasia “suave”, nic 1) e lesão intraepitelial de alto grau h-Sil (inclui:

displasia moderada e grave, nic II, nic III ou carcinoma in-situ); carcinoma pavimento-celular (epidermóide)

4.2) Anomalias em células glandulares: células atípicas (agc), endocervicais, endometriais ou “sem outra especificação” (SOE); células atípicas sugestivas de neoplasia, endocervicais ou SOE; provável adenocarcinoma in-situ do endocolo (AIS) e adenocarcinoma, SOE, endocervical, endometrial, extra-uterino.

5) Outra neoplasia maligna: especificar

6) Ausência de lesão intraepitelial, com presença de células endometriais.

Anexo F: Classificação Colposcópica da Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia aprovada em 2002:

I. Achados Colposcópicos Normais: Epitélio Escamoso Original, Epitélio Colunar, Zona de Transformação;

II. Achados Colposcópicos Anormais: Epitélio acetobranco plano, Epitélio acetobranco denso, Mosaico fino, Mosaico grosseiro, Pontilhado fino, Pontilhado grosseiro, Iodo Parcialmente positivo, Iodo Negativo, Vasos atípicos;

III. Alterações colposcópicas sugestivas de câncer invasivo:

IV. Colposcopia insatisfatória: Junção Escamo-colunar não visível, Inflamação severa, atrofia severa, trauma, Cérvix não visível;

V. Miscelânea: Condiloma, Queratose, Erosão, Inflamação, Atrofia, Decidua, Pólipo;

Características colposcópicas sugestivas de alterações metaplásicas: superfície lisa com vasos finos, de calibre uniforme, alterações acetobranças leves, iodo negativo ou parcialmente positivo com solução de Lugol.

Características colposcópicas sugestivas de alterações de baixo grau (alterações menores): superfície lisa com borda externa irregular. Alteração acetobranca leve, que aparece lentamente e desaparece rapidamente. Iodo negativo, freqüentemente com parcial captação de iodo positivo. Pontilhado fino e mosaico fino regular.

Características colposcópicas sugestivas de alterações de alto grau (alterações maiores): Superfície lisa com borda externa bem marcada. Alteração acetobranca densa, que aparece rapidamente e desaparece lentamente; podendo apresentar um branco nacarado que lembra o de ostra. Iodo negativo (coloração amarelo-mostarda) em epitélio densamente

acetobranco. Pontilhado grosseiro e mosaico de campos largos e irregulares e de tamanhos diferentes. Acetobranqueamento denso no epitélio colunar pode indicar doença glandular.

Características colposcópicas sugestivas de câncer invasivo: Superfície irregular, erosão, ou ulceração. Acetobranqueamento denso. Pontilhado grosseiro e irregular e mosaico grosseiro de campos largos desiguais. Vasos atípicos.

Anexo G: Critérios de Richart para o diagnóstico histopatológico cervical:

NIC 1 (lesão intra-epitelial de baixo grau):

A maturação está presente nos 2/3 superiores do epitélio, embora núcleos anormais possam existir em toda a espessura epitelial. As células superficiais poderão apresentar efeito citopático viral (coilócito). Há alteração nuclear no epitélio principalmente no terço basal. Mitoses poderão estar presentes, porém restritas a camada basal e serão típicas. Poderá haver disqueratose

NIC 2 e NIC 3 (lesão intra-epitelial de alto grau):

NIC 2: A maturação estará presente na parte superior do epitélio. As mitoses poderão estar presentes nos dois terços inferiores epiteliais. A presença de coilócitos é menos freqüente e as atípicas nucleares mais pronunciadas, além da disqueratose.

NIC 3: a maturação poderá estar presente apenas na porção superior do epitélio. As alterações nucleares serão intensas e distribuídas por toda a extensão epitelial. As mitoses serão numerosas, sendo encontradas em toda espessura do epitélio. Poderá haver mitoses atípicas.