



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**O SIGNIFICADO DA EXPRESSÃO DE p16^{INK4A} E Ki-67 EM BIÓPSIA DE
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL DE GRAU II**

Amanda Leal Ferreira

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2018



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**O SIGNIFICADO DA EXPRESSÃO DE p16^{INK4A} E Ki-67 EM BIÓPSIA DE
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL DE GRAU II**

Amanda Leal Ferreira

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2018



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**O SIGNIFICADO DA EXPRESSÃO DE p16^{INK4A} E Ki-67 EM BIÓPSIA DE
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL DE GRAU II**

Amanda Leal Ferreira

Dissertação apresentada à
Pós-graduação em Pesquisa
Aplicada à Saúde da Criança e
da Mulher, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Cecília Vianna de Andrade

Coorientador: Dr. Fábio Bastos Russomano

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Ferreira, Amanda Leal.

O significado da expressão de p16INK4A e Ki-67 em biópsia de Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau II / Amanda Leal Ferreira. - Rio de Janeiro, 2018.

107 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2018.

Orientadora: Cecília Vianna de Andrade.

Co-orientador: Fábio Bastos Russomano.

Bibliografia: f. 92-101

1. neoplasia intraepitelial cervical. 2. imuno-histoquímica. 3. inibidor p16 de ciclina dependente de quinase. 4. antígeno Ki-67. 5. análise quantitativa. I. Título.

À minha amada avó Zeny da Silva Leal (em memória), que com tamanho zelo me encorajou diante de cada etapa de minha vida e me ensinou a fazer tudo o que eu me proponho com dedicação, responsabilidade e amor.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade de alcançar mais um objetivo e por ter me sustentado nos momentos de grande dificuldade e incerteza.

À minha orientadora, Cecília Vianna de Andrade, pelo exemplo profissional e empenho na realização desse trabalho, superando todos os contratemplos apresentados ao longo desse período.

Ao meu coorientador, Fábio Bastos Russomano, pela disponibilidade e comprometimento na realização desse trabalho.

À banca do exame de qualificação pelas importantes contribuições para enriquecimento do estudo e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa.

Aos meus pais que com amor incondicional não mediram esforços para a realização de mais essa etapa, me apoiando e encorajando durante todo o período do mestrado.

Aos meus irmãos pelo incentivo e cuidado dedicados a mim nos momentos difíceis.

Ao meu noivo por entender minha ausência e me apoiar em todas as minhas decisões.

Agradeço à minha família e aos amigos por proporcionarem momentos de alegria e descanso e acreditarem em mim, me incentivando a alcançar mais um objetivo.

À Nilma Valéria Caldeira Ferreira pelo carinho e dedicação à realização do projeto, me acompanhando em todas as reações de imuno-histoquímica.

Ao Davy Carlos Mendes Rapozo pela contribuição na realização deste projeto e pela generosidade em transmitir seus conhecimentos.

Agradeço também a todos que dedicaram seu tempo na realização deste trabalho, Dione Correa de Araujo Dock, Elyzabeth Avvad Portari e Saint Clair Gomes Junior.

Às meninas que compartilharam comigo os momentos de insegurança e me auxiliaram na construção deste trabalho, Viviane Rodrigues da Silva, Nasle Domingues Dibe e Bruna Rodrigues de Paiva.

Aos colegas do Departamento de Anatomia Patológica e Citopatologia (DAPC) que transmitiram seus conhecimentos por meio de suas experiências e me incentivaram na busca por novas conquistas.

Aos profissionais do arquivo do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz) pela prontidão na solução de nossas demandas e aos profissionais da Divisão de Patologia (DIPAT/INCA) e Banco Nacional de Tumores (BNT/INCA) por me acolherem durante o período em que estive realizando a digitalização das lâminas, especialmente à Priscila Valverde Fernandes pela presteza na realização das reações de imuno-histoquímica.

Meu reconhecimento aos professores da Pós Graduação em Pesquisa Aplicada em Saúde da Criança e da Mulher que contribuíram de forma enriquecedora na minha formação profissional e acadêmica e na construção deste trabalho e à secretaria acadêmica pela disponibilidade em solucionar os problemas, sempre com rapidez e eficiência.

Aos meus colegas de turma que compartilharam comigo os momentos difíceis dessa caminhada, tornando-os mais agradáveis, sempre com muito bom humor.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Lista de siglas

BNT	Banco Nacional de Tumores e DNA
CA	Carcinoma
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CDK	Ciclina Dependente de Kinase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Diaminobenzina
DAPC	Departamento de Anatomia Patológica e Citopatologia
DIPAT	Divisão de Patologia
DP	Desvio padrão
E	Precoce (do inglês, <i>early</i>)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
H&E	Hematoxilina e eosina
HPV	Papilomavírus humano (do inglês, <i>Human papillomavirus</i>)
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (do inglês, <i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>)
IFF	Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
KW	Kruskal Wallis
LAST	Terminologia das Lesões Escamosas do Trato Anogenital Inferior (do inglês, <i>The Lower Anogenital Squamous Terminology</i>)
LSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (do inglês, <i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>)
MS	Ministério da Saúde
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
Rb	Retinoblastoma
S	Síntese
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	Matriz de tecido (do inglês, <i>Tissue microarray</i>)
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

Lista de símbolos

μm	micrômetro
κ	Kappa
χ^2	Teste de qui quadrado
mm^2	milímetros quadrados
ρ	Teste de Spearman

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes na população feminina brasileira estimados para o biênio 2018-2019, exceto pele não melanoma.....	233
Figura 2. Histologia de NIC II.	288
Figura 3. Concordância interobservador para as categorias diagnósticas de inflamatório (negativo), NIC I, NIC II, NIC III e carcinoma (CA).....	299
Figura 4. Mimetização de uma lesão de alto grau no epitélio escamoso	30
Figura 5. Esquema da LAST para uso de p16 para avaliar a categoria diagnóstica de NIC II	355
Figura 6. Papel de p16 e influência das oncoproteínas virais no ciclo celular..	377
Figura 7. Marcação imuno-histoquímica de p16 em amostra de NIC II.....	388
Figura 8. Marcação imuno-histoquímica de Ki-67 em amostra de NIC II	40
Figura 9. Padrão de marcação de p16	488
Figura 10. Padrão de marcação de Ki-67.....	499
Figura 11. Quantificação das marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67.	50
Figura 12. Fluxograma de casos incluídos no estudo.	555
Figura 13. Categorias diagnósticas definidas pelo consenso do grupo revisor.	577
Figura 14. Ilustração dos casos divergentes entre o consenso do grupo revisor e o resultado da quantificação digital de imagem na avaliação de p16.....	644
Figura 15. Ilustração dos casos divergentes entre o consenso do grupo revisor e o resultado da quantificação digital de imagem na avaliação de Ki-67.	666

Lista de tabelas

Tabela 1. Concordância interobservador para o diagnóstico de H&E e imunomarcações.	566
Tabela 2. Distribuição dos casos por categoria diagnóstica.....	588
Tabela 3. Nível de significância observado nas comparações das variáveis de quantificação entre os diagnósticos da biópsia na coloração de H&E.	599
Tabela 4. Estatística descritiva e comparações entre o resultado da quantificação digital de imagem e as categorias diagnósticas de p16	60
Tabela 5. Perfil de marcação nas categorias diagnósticas na marcação de p16.611	
Tabela 6. Perfil de marcação das categorias diagnósticas na marcação de Ki-67.	622
Tabela 7. Distribuição do <i>status</i> de p16 entre a quantificação digital e o consenso do grupo revisor.	622
Tabela 8. Distribuição da classificação de Ki-67 entre a quantificação digital e o consenso do grupo revisor.	655
Tabela 9. Distribuição do consenso do grupo revisor na coloração de H&E em relação ao padrão ouro.	677
Tabela 10. Distribuição do <i>status</i> de p16 em relação ao padrão ouro.	688
Tabela 11. Distribuição do <i>status</i> de Ki-67 em relação ao padrão ouro.	699
Tabela 12. Distribuição da porcentagem de marcação de Ki-67 nos terços em relação ao padrão ouro	70
Tabela 13. Avaliação de desempenho diagnóstico na avaliação da coloração de H&E e do <i>status</i> da marcação imuno-histoquímica para o padrão ouro de \leq NIC I e \geq NIC II.	711

Tabela 14. Avaliação de desempenho diagnóstico na avaliação da coloração de H&E e das marcações imuno-histoquímicas para o padrão ouro de \leq NIC II e \geq NIC III.	722
Tabela 15. Combinação do <i>status</i> de p16 e Ki-67 em relação ao padrão ouro na avaliação do <i>status</i> consolidado.....	733
Tabela 16. Distribuição da conduta aplicada a paciente em relação ao padrão ouro.	744
Tabela 17. Classificação LAST e <i>status</i> de p16 em relação do padrão ouro de acordo com a conduta clínica.	755
Tabela 18. <i>Status</i> de Ki-67 consolidado em relação do padrão ouro de acordo com a conduta clínica.....	766

RESUMO

A neoplasia intraepitelial cervical grau II (NIC II) é um estágio intermediário do desenvolvimento do câncer do colo do útero, que apesar de ser considerada uma lesão precursora do câncer apresenta altas taxas de regressão. As limitações inerentes ao diagnóstico histopatológico, principalmente nessa categoria diagnóstica, podem comprometer o manejo clínico adequado. A fim de melhorar a confiabilidade do diagnóstico da biópsia cervical, alguns biomarcadores estão sendo estudados, como o p16 e o Ki-67. **Objetivo:** compreender o significado da expressão de p16 e Ki-67 nas biópsias cervicais com diagnóstico de NIC II. **Materiais e métodos:** Foram analisadas 104 biópsias de colo uterino com diagnóstico original de NIC II, provenientes do Departamento de Anatomia Patológica e Citopatologia (DAPC) do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, da Fundação Oswaldo Cruz (IFF/Fiocruz) no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2016 com diagnóstico de peça cirúrgica ou exames de seguimento clínico até um ano após o diagnóstico inicial de NIC II. A expressão dos biomarcadores p16 e Ki-67 foi avaliada qualitativamente por um grupo de patologistas experientes e quantitativamente pelo método de quantificação digital e comparadas com os resultados de padrão ouro. **Resultados:** Cento e quatro casos de biópsia de colo uterino com diagnóstico original de NIC II foram incluídos no estudo. A concordância interobservador na avaliação das biópsias na coloração de rotina e nas imunomarcações se manteve substancial, sendo a classificação dicotômica de p16 mais reprodutível do que a classificação histológica convencional. A avaliação qualitativa e quantitativa das marcações imunohistoquímicas foram equivalentes. O *status* de p16 não apresentou relação com o diagnóstico de padrão ouro, mas apresentou alta sensibilidade e alto valor preditivo negativo para o diagnóstico de NIC III no padrão ouro. Em contrapartida, o *status* de Ki-67 apresentou associação com o padrão ouro e mostrou ser um biomarcador específico e com alto valor preditivo negativo para NIC II e alto valor preditivo positivo para NIC II ou mais grave. O uso da classificação dicotômica para p16 na rotina clínica causaria grande quantidade de sobretratamentos, enquanto que o uso do Ki-67 causaria subtratamento mais frequentemente. **Conclusão:** O biomarcador p16 não se apresentou como um bom preditor de lesão de maior gravidade no padrão ouro, causando mais casos de sobretratamento devido a sua alta sensibilidade. A aplicabilidade de Ki-67 para definição de conduta é limitada devido a sua baixa sensibilidade, apesar da alta especificidade e de sua associação com o padrão ouro, induzindo maior número de casos subtratados.

Palavras-chave: neoplasia intraepitelial cervical; imuno-histoquímica; inibidor p16 de ciclina dependente de quinase; antígeno Ki-67; análise quantitativa.

ABSTRACT

Cervical intraepithelial neoplasia grade II (CIN II) is an intermediate state of cervical cancer development, despite being considered a cancer precursor lesion that has high regression rates. The limitations inherent to histopathological diagnosis, especially in this diagnostic category, may compromise adequate clinical management. In order to improve the diagnostic reliability of cervical biopsy, some biomarkers are being studied, such as p16 and Ki-67. **Objective:** The aim of the study is to understand the significance of p16 and Ki-67 expression in cervical biopsies diagnosed with CIN II. **Materials and methods:** We analyzed 104 cervical biopsies with original diagnosis of CIN II from the Department of Pathological Anatomy and Cytopathology (DPAC) of the National Institute of Women, Child and Adolescent Health Fernandes Figueira, of the Oswaldo Cruz Foundation (IFF/Fiocruz), of the period from January 2006 to December 2016 with diagnosis of surgical specimen or clinical follow-up examinations until one year after the initial diagnosis of CIN II. The expression of the biomarkers p16 and Ki-67 was evaluated qualitatively by a group of experienced pathologists and quantitatively by the digital image analysis method. **Results:** One hundred and four cases of cervical biopsy diagnosed with CIN II were included in the study. Interobserver agreement of cervical biopsies evaluation in the routine staining and immunostaining remained substantial, with the dichotomous classification of p16 being more reproducible than conventional histological classification. The qualitative and quantitative evaluation of immunohistochemical staining was equivalent. The status of p16 was not related to the diagnosis of gold standard, but performed a high sensitivity. In contrast, Ki-67 status was associated with the gold standard and showed to be a specific biomarker. The use of dichotomous classification for p16 in the clinical routine could cause a large amount of overtreatment, whereas use of Ki-67 could cause undertreatment more frequently. **Conclusion:** The p16 biomarker did not perform to be a good predictor of greater severity in the gold standard, leading to overtreatment due to its high sensitivity. The applicability of Ki-67 to the definition of clinical conduct is limited due to its low sensitivity, despite the high specificity and its association with the gold standard, inducing a greater number of undertreated cases.

Key words: cervical intraepithelial neoplasia; immunohistochemistry; cyclin-dependent kinase inhibitor p16; Ki-67 antigen; quantitative analysis.

Sumário

Capítulo 1 – Introdução	16
Capítulo 2 – Justificativa	19
Capítulo 3 – Objetivos	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
Capítulo 4 – Referencial teórico	23
4.1 Câncer do colo do útero	23
4.1.1 <i>Papillomavirus humano</i>	24
4.2 Neoplasia intraepitelial cervical	26
4.2.1 <i>Neoplasia intraepitelial cervical grau II</i>	27
4.2.2 <i>Limitações do diagnóstico histopatológico</i>	28
4.2.3 <i>História Natural</i>	31
4.2.4 <i>Abordagem Clínica</i>	32
4.3 Projeto LAST	33
4.4 p16	36
4.4.1 <i>Utilidades clínicas do uso de p16</i>	38
4.5 Ki-67	39
4.5.1 <i>Utilidades clínicas do uso de Ki-67</i>	41
Capítulo 5 – Hipótese	42
Capítulo 6 – Materiais e métodos	43
6.1 Critérios de inclusão e exclusão	43
6.1.1 <i>Critérios de inclusão</i>	43
6.1.2 <i>Critérios de exclusão</i>	43
6.2 Imuno-histoquímica	44
6.3 Revisão das lâminas histológicas.....	46
6.4. Avaliação das marcações imuno-histoquímicas.....	46
6.4.1 <i>Critérios gerais de avaliação</i>	46
6.4.2 <i>Avaliação da marcação de p16</i>	47
6.4.3 <i>Avaliação da marcação de Ki-67</i>	48
6.5 Quantificação da marcação imuno-histoquímica de p16 e Ki-67.....	49

6.6	Categorização do padrão-ouro.....	50
6.7	Análise estatística	51
	Capítulo 7 – Questões éticas.....	53
	Capítulo 8 – Resultados.....	54
8.1	Descrição da amostra	54
8.2	Concordância interobservador	55
8.3	Avaliação das marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67.....	56
8.4	Quantificação digital das marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67.....	58
8.5	<i>Status</i> de p16 e Ki-67: consenso do grupo revisor <i>versus</i> quantificação digital de imagem	62
8.6	Associação da marcação imuno-histoquímica de p16 e Ki-67 e o diagnóstico padrão ouro.....	67
8.7	Desempenho diagnóstico das marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67	71
8.8	Impacto clínico da aplicação das recomendações LAST para p16 e o ponto de corte de Ki-67.	73
	Capítulo 9 – Discussão	77
	Capítulo 10 – Conclusões.....	91
	Referências bibliográficas.....	92
	APÊNDICE A – Ficha de coleta	102
	APÊNDICE B – Instruções para preenchimento da ficha de coleta	103
	ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP.....	105

Capítulo 1 – Introdução

O câncer do colo do útero é um problema de saúde pública, ocupando a quarta posição entre os tipos de câncer mais frequentes na população feminina no Brasil¹.

O principal fator de risco para o câncer do colo uterino é a infecção persistente por diferentes tipos de papilomavírus humano (HPV). A infecção por HPV é uma causa necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, podendo se comportar como uma manifestação morfológica transitória ou como lesão precursora do câncer.

As lesões do colo do útero, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), são caracterizadas pela maturação anormal das células ocupando a espessura parcial ou total do epitélio escamoso cervical. A neoplasia intraepitelial grau II (NIC II) é um estágio intermediário da doença cervical entre NIC I e NIC III, onde NIC I é considerada lesão de baixo risco para progressão e NIC III, assim como a NIC II, como uma lesão precursora do câncer.

As Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero recomendam que seja realizado tratamento excisional em mulheres com diagnóstico de NIC II. No entanto, é recomendado que pacientes jovens sejam acompanhadas clinicamente, pois a lesão de NIC II tem maior chance de regredir nessa faixa etária².

O resultado do exame histopatológico da biópsia do colo uterino é considerado o padrão ouro para o diagnóstico das NIC, fundamentando a escolha da conduta clínica adotada para cada paciente. Contudo, a baixa

reprodutibilidade entre os patologistas, especialmente a categoria diagnóstica de NIC II, pode comprometer o manejo clínico adequado.

Tendo em vista as limitações do diagnóstico histopatológico da NIC e suas implicações, alguns biomarcadores tem sido estudados na tentativa de aumentar a confiabilidade diagnóstica. Diversos autores demonstram a utilidade da marcação imuno-histoquímica de p16 e Ki-67 para o diagnóstico diferencial entre lesões de alto grau e seus mimetizadores.

A p16 é uma proteína inibidora da ciclina dependente de cinase 4 e 6 (CDK-4 e 6), que regula a transição da fase G1 do ciclo celular para a fase S. A proteína Ki-67 é uma proteína nuclear expressa durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), exceto em G0 e fase inicial de G1. A proteína viral E7 promove a progressão do ciclo celular, por interromper a ligação da proteína Rb com E2F, levando ao acúmulo de p16 na célula e à progressão no ciclo celular nas infecções de HPV de alto risco.

Em 2012, foi publicada a Terminologia das Lesões Escamosas do Trato Anogenital Inferior (do inglês, *The Lower Anogenital Squamous Terminology, LAST*), que propõe o uso do p16 nas amostras de NIC II a fim de definir se a referida lesão seria de alto ou baixo grau³. A nova classificação prevê abordagens terapêuticas diferentes nos casos de NIC II negativos para p16, mas ainda são necessários estudos de validação clínica.

Apesar de terem sido sugeridos benefícios no uso dos marcadores p16 e Ki-67 para melhorar a concordância diagnóstica das lesões de NIC II e sua expressão estar relacionada à gravidade das NIC, ainda não existe consenso

sobre o ponto de corte que determine seu perfil de expressão positiva e sua utilidade em diferenciar lesões de alto e baixo grau.

O presente estudo visa avaliar o impacto clínico da expressão de p16 e Ki-67 no diagnóstico e na indicação de tratamento em mulheres com biópsia de NIC II, correlacionando os perfis de marcação encontrados nas biópsias com os achados de acompanhamento clínico ou de peça cirúrgica de tratamento.

Capítulo 2 – Justificativa

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum na população feminina e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil, sendo mais frequentemente diagnosticado em regiões menos desenvolvidas^{1,4}.

Este tipo de câncer tem alto potencial de prevenção e cura se diagnosticado precocemente⁵ em um programa de rastreio organizado. No entanto, na rotina dos nossos serviços de saúde o rastreamento é feito de forma oportunística⁶, o que resulta em baixa cobertura restrita às mulheres que buscam de forma espontânea os serviços de saúde, configurando um cenário de desigualdade no acesso e uso ineficiente de recursos⁵.

O câncer do colo do útero é uma doença de evolução lenta⁷ e apresenta lesões precursoras, conhecidas como lesão de alto grau ou NIC II e NIC III. A NIC I representa a manifestação morfológica da infecção por HPV transitória, com alta probabilidade de regressão e, por isso não é considerada uma lesão precursora do câncer do colo uterino².

Apesar de a NIC II ser considerada uma lesão de alto grau, estudos mostram que a taxa de regressão é alta nesses casos⁸. Está claro que nem todas as lesões consideradas precursoras progridem para o câncer, mas ainda não sabemos o perfil da lesão que se torna maligna quando não tratada.

A reprodutibilidade interobservador do diagnóstico da NIC é crítica nos programas de prevenção do câncer do colo do útero, sendo o diagnóstico de NIC II o que possui menor reprodutibilidade entre os patologistas^{9,10,11}. Além disso, a sub-representação da lesão presente no colo uterino e a mimetização das lesões de alto grau podem comprometer o diagnóstico histopatológico³.

A conduta clínica apropriada depende do diagnóstico acurado das biópsias cervicais, pois resultados falso-positivos podem conduzir ao tratamento desnecessário, aumentando o risco de morbidade obstétrica e neonatal, como parto prematuro, principalmente em mulheres jovens sem prole constituída^{2,12}, enquanto que em pacientes com resultados falso-negativos ocorre o adiamento do tratamento, possibilitando a eventual progressão da doença para a fase invasiva.

Tendo em vista as limitações que cercam o diagnóstico histopatológico da NIC, foi publicado, em 2012, um conjunto de recomendações pelo Colégio Americano de Patologistas e a Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical, denominada LAST. Esse projeto sugere a utilização de p16 para auxiliar o diagnóstico histopatológico da NIC II, propondo que essa categoria diagnóstica seja classificada como lesão de alto grau se a marcação de p16 for positiva ou lesão de baixo grau caso a marcação de p16 seja negativa³. No entanto, os critérios de positividade para p16 nessa publicação foram arbitrados por um conjunto de especialistas, necessitando ainda de estudos de validação clínica para sua implementação na rotina diagnóstica dos serviços de saúde.

Com a proposta de ser um biomarcador complementar no diagnóstico histológico, a p16 tem sido associada ao grau de alteração celular observada no epitélio escamoso, ao aumento da concordância interobservador e apontada como um marcador de progressão para câncer^{13,14,15}. Além disso, a expressão de p16 pode melhorar o valor preditivo positivo dos resultados do rastreio cervical¹⁶ e se mostra como um marcador sensível e específico de NIC e carcinoma associado ao HPV¹⁷.

Apesar de o uso do biomarcador Ki-67 não constar nas recomendações LAST, estudos tem mostrado associação entre a expressão positiva de Ki-67 em biópsias de NIC II e o desfecho¹⁴ ou diagnóstico de NIC III em peça de tratamento posterior¹³. Além disso, a marcação de Ki-67 tem sido mostrada como uma ferramenta útil para predizer o grau de NIC e está correlacionada com a presença de HPV oncogênico e com a progressão de NIC em biópsias de NIC I e NIC II^{14,18}.

O presente estudo se justifica pela possibilidade de melhor compreensão do significado da marcação imuno-histoquímica ao correlacionar a expressão de p16 e Ki-67 com os achados das peças de tratamento cirúrgico ou com os dados de acompanhamento dos casos que tinham essa indicação clínica.

O atual estudo seria também uma forma de podermos avaliar o ponto de corte sugerido pela LAST e verificar qual seria o impacto da aplicação dessas recomendações, implicando em maior ou menor número de indicações de tratamento das pacientes anteriormente diagnosticadas como portadoras de NIC II.

Capítulo 3 – Objetivos

2.1 Objetivo geral

Compreender a contribuição para o diagnóstico e a implicação clínica da expressão de p16 e Ki-67 em biópsias cervicais com diagnóstico de NIC II.

2.2 Objetivos específicos

- I. Comparar a concordância diagnóstica dos patologistas na coloração de rotina e nas marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67.
- II. Comparar a avaliação dos patologistas com os resultados da quantificação digital de imagem para as marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67;
- III. Avaliar a associação da expressão de p16 e Ki-67 em biópsias de NIC II com os resultados de peça de tratamento ou exames de seguimento clínico até um ano;
- IV. Avaliar o desempenho diagnóstico de p16 e Ki-67 em biópsias de NIC II para o diagnóstico de lesões de alto grau ou câncer nas peças de tratamento ou no seguimento de até um ano;
- V. Descrever o impacto clínico da aplicação das recomendações da LAST para p16 e do ponto de corte de Ki-67 nos casos diagnosticados como NIC II.

Capítulo 4 – Referencial teórico

4.1 Câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero é considerado um importante problema de saúde pública. Com incidência de 528 mil casos e 266 mil óbitos, o câncer cervical se apresenta como o quarto tipo de câncer mais comum na população feminina mundial^{19,20}.

No Brasil, a estimativa para o biênio 2018-2019 é de 16.370 novos casos de câncer cervical, com risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres. Ocupa a terceira posição entre os tipos de câncer mais incidentes na população feminina do país, atrás apenas do câncer de mama e cólon e reto, quando se exclui o câncer de pele não melanoma (Figura 1). Em 2015, a mortalidade de mulheres por este tipo de câncer superou os 5 mil óbitos¹.


	Localização Primária	Casos	%
Mulheres 	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes na população feminina brasileira estimados para o biênio 2018-2019, exceto pele não melanoma. O câncer de colo de útero ocupa a terceira posição entre os tipos mais incidentes na população feminina brasileira, atrás apenas do câncer de mama e cólon e reto. Adaptado de: Brasil/MS/INCA, 2017¹.

A taxa de incidência de câncer do colo do útero tem diminuído ao longo das últimas três décadas como resultado da implementação dos programas de prevenção, quando também foi observado aumento na sobrevivência de cinco anos, atingindo a marca de 70% para a população mundial⁴.

No entanto, a variação geográfica mundial nas taxas de câncer do colo do útero refletem as diferenças na desigualdade de acesso à prevenção. Nas regiões menos desenvolvidas contribui de forma importante para a carga da doença em mulheres, figurando como o segundo mais incidente e como a terceira principal causa de morte por câncer em mulheres^{19,21}.

Reconhecendo que o HPV é uma causa necessária para o câncer cervical e que a vacinação para prevenção do HPV representa a redução da incidência do câncer do colo do útero e de suas lesões precursoras, o Ministério da Saúde implementou a vacina tetravalente contra o HPV, que protege contra os subtipos 6, 11, 16 e 18, no calendário vacinal brasileiro em 2014 para meninas de 9 a 13 anos. No entanto, a vacinação não dispensa a realização dos exames de rastreio para o câncer do colo do útero, pois a baixa adesão à vacinação contra o HPV e a existência de outros subtipos oncogênicos do vírus que não são cobertos pela vacina tetravalente implicam em manutenção de algum risco de desenvolvimento de câncer^{4,22}.

4.1.1 *Papillomavirus humano*

A infecção pelo *Papillomavirus humano* (HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer do colo do útero^{23,24,25}, detectável em 99,7% dos casos de câncer cervical²³.

O HPV interage com o epitélio escamoso de duas formas. Em uma das formas de interação, o epitélio sustenta a produção viral, mas as lesões são transitórias, chamadas de lesões de baixo grau. A segunda forma de interação é caracterizada pela incorporação do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, com quebra do controle coordenado entre a expressão do gene viral e a diferenciação epitelial, dando origem às lesões precursoras do câncer do colo do útero. A expressão dos oncogenes virais E6 e E7 conduz à proliferação celular, produzindo uma expansão clonal de células indiferenciadas caracterizadas pela infecção viral persistente, anormalidades colposcópicas, lesões persistentes e progressivas e risco aumentado de transformação maligna³.

Dessa forma, a infecção por HPV não é suficiente para o desenvolvimento do câncer, fazendo-se necessária a persistência da infecção viral^{4,26}, que está relacionada com o tipo de HPV detectado. Mais de 200 genótipos de HPV foram caracterizados molecularmente, e cerca de 40 tipos são capazes de causar infecção no trato genital²⁷, sendo classificados como HPV de baixo e alto risco oncogênico em função de sua associação com o câncer cervical^{28,29}.

Os HPV de baixo risco estão associados com lesões benignas, como as verrugas genitais e as lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL, do inglês, *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion* ou NIC I). Cerca de 90% das verrugas genitais são causadas por HPV 6 e 11²⁸.

Infecções por HPV de alto risco oncogênico estão fortemente associadas com o desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL, do inglês, *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion* ou NIC II/III) e câncer cervical³⁰. Os

tipos de HPV 16 e 18 são detectados em cerca de 70% dos casos de câncer do colo do útero²⁹.

4.2 Neoplasia intraepitelial cervical

As lesões pré-neoplásicas do câncer do colo do útero foram inicialmente descritas por Cullen, em 1900, e Rubin, em 1910, como achados histopatológicos em bordas de tumores invasores, representadas por células com aspectos morfológicos semelhantes às do carcinoma invasor, porém, contidas dentro do epitélio transformado³¹.

Em 1949, Papanicolaou introduziu o termo displasia, relatado por Reagan *et al.*, em 1953, para caracterizar a presença de células atípicas em parte ou toda a espessura da camada epitelial³², dividindo-a em leve, moderada, acentuada e carcinoma *in situ*². Essa classificação seria modificada em 1973 por sugestão da Organização Mundial da Saúde (OMS), que passou a agrupar as categorias displasia acentuada e carcinoma *in situ* em uma única classe³³.

O conceito de NIC foi estabelecido por Richart, em 1967, para lesões precursoras do carcinoma escamoso invasor do colo uterino³⁴ e definido, segundo Aidé (2009)³³, como “lesões proliferativas com maturação anormal e atipias de graus variáveis substituindo parte ou toda a espessura do epitélio escamoso cervical”. Dessa forma, as lesões do colo uterino podem ser classificadas histologicamente em três graus: NIC I, NIC II e NIC III. O diagnóstico de NIC I apresenta células maduras e diferenciadas em grande parte da espessura epitelial e presença de anomalias nucleares mínimas, com células indiferenciadas restritas ao terço inferior do epitélio, enquanto que, na NIC III a diferenciação e estratificação podem estar ausentes ou presentes apenas em

pequena parte do terço superficial do tecido epitelial cervical com anomalias nucleares na espessura total do epitélio³⁵. O conceito de NIC II será abordado a seguir devido a sua relevância para o estudo.

Baseado no Sistema Bethesda (1988), que propunha uma nova classificação citológica cervical com objetivo de facilitar o manejo clínico das NIC, Richart transportou os conceitos citológicos para a histologia, classificando NIC I como uma lesão intraepitelial escamosa de baixo grau e agrupando NIC II e NIC III como lesões intraepiteliais escamosas de alto grau³³.

4.2.1 Neoplasia intraepitelial cervical grau II

A neoplasia intraepitelial grau II (NIC II) é o diagnóstico intermediário da doença cervical entre NIC I, que é considerada uma lesão de baixo grau e, portanto, com baixo risco de progressão, e NIC III. NIC II e III são consideradas lesões pré-neoplásicas, ou seja, com risco de progressão para câncer³⁶.

NIC II é caracterizada pela presença de células imaturas restritas aos dois terços inferiores da camada epitelial, com anomalias nucleares mais acentuadas que em NIC I e as figuras de mitose podem ser observadas na metade inferior do epitélio³⁷ (Figura 2).

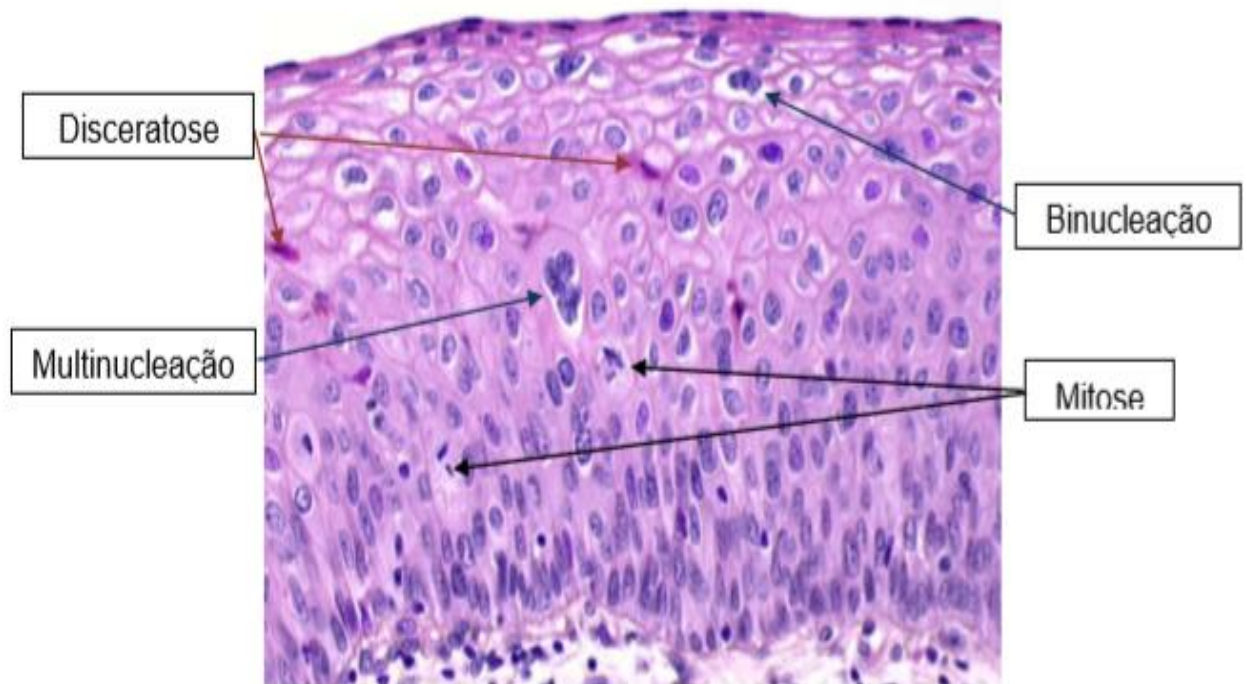


Figura 2. Histologia de NIC II. Amostra de colo uterino classificada como NIC II apresentando coilocitose (halos claros perinucleares), arquitetura tecidual da metade inferior do epitélio desorganizada, presença de mitoses fora da camada basal, anisocariose (irregularidade do contorno nuclear), disceratose, binucleação, multinucleação. Fonte: IARC³⁸.

4.2.2 Limitações do diagnóstico histopatológico

O diagnóstico histopatológico apresenta limitações relacionadas à baixa reprodutibilidade do diagnóstico, acurácia variável, problemas de representatividade da amostra e a mimetização de lesões intraepiteliais.

A reprodutibilidade interobservador é crítica nos programas de prevenção do câncer do colo do útero. De forma geral, o acordo entre os patologistas é excelente para lesões invasivas, moderado para NIC III e fraco para NIC I e NIC II baseados somente na histologia⁹. O diagnóstico de NIC II é um dos que possui menor reprodutibilidade entre os patologistas, podendo ser comprometido tanto pela preparação da peça histológica quanto pela interpretação do observador^{10,11}. Em seu estudo, Castle *et al.* (2007)¹¹ demonstraram que apenas

43,4% dos casos de NIC II ao serem submetidos à avaliação pelo grupo de controle de qualidade de patologia foram também avaliados como NIC II, demonstrando baixa reprodutibilidade.

Em estudo conduzido no Departamento de Anatomia Patológica e Citopatologia (DAPC) do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), foi demonstrado que os diagnósticos de maior gravidade (NIC III e carcinoma) tendem a ter uma maior concordância interobservador e que os diagnósticos de menor gravidade são menos reprodutíveis. A concordância para a categoria diagnóstica de NIC II possuiu o menor coeficiente de concordância (Kappa) dentre as categorias, revelando ser um diagnóstico de concordância fraca³⁹, de acordo com a classificação de Landis e Koch (Figura 3).

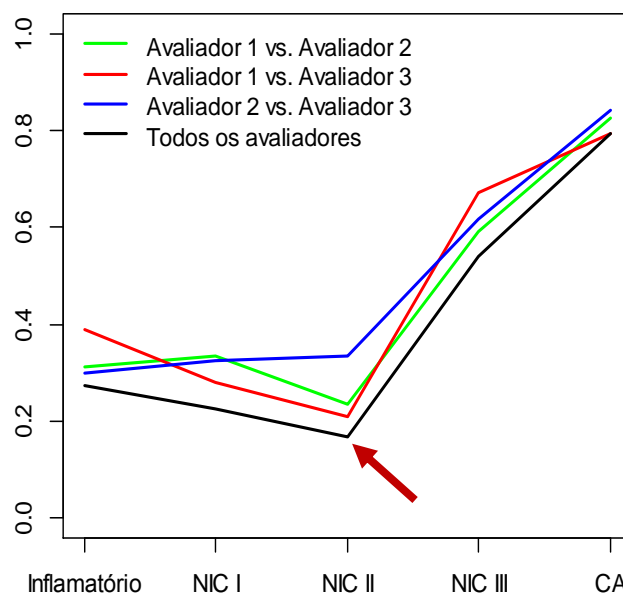


Figura 3. Concordância interobservador para as categorias diagnósticas de inflamatório (negativo), NIC I, NIC II, NIC III e carcinoma (CA). A categoria diagnóstica de NIC II apresentou o menor coeficiente de concordância dentre as categorias apresentadas. Fonte: FERREIRA, 2015³⁹.

Os estudos de variabilidade interobservador revelam que a discordância diagnóstica tem efeito importante nas decisões de tratamento (NIC I *versus* NIC II/III), já que a concordância é maior para as lesões pré-neoplásicas (NIC III) que são, indiscutivelmente, indicadas para tratamento¹⁷.

As questões de amostragem também podem comprometer o diagnóstico das biópsias, que podem não revelar as lesões de maior gravidade presentes na amostra, levando a sub-representação da lesão presente no colo uterino. A obtenção de biópsias de maior tamanho e aumento do número de biópsias avaliam com maior precisão a lesão presente ou o risco de câncer de cada paciente³.

Processos como metaplasia escamosa imatura, atrofia, alterações epiteliais reparadoras ou a orientação do corte podem mimetizar uma lesão pré-neoplásica, podendo gerar uma conduta clínica inadequada, apesar de não estarem associadas a risco neoplásico³ (Figura 4).

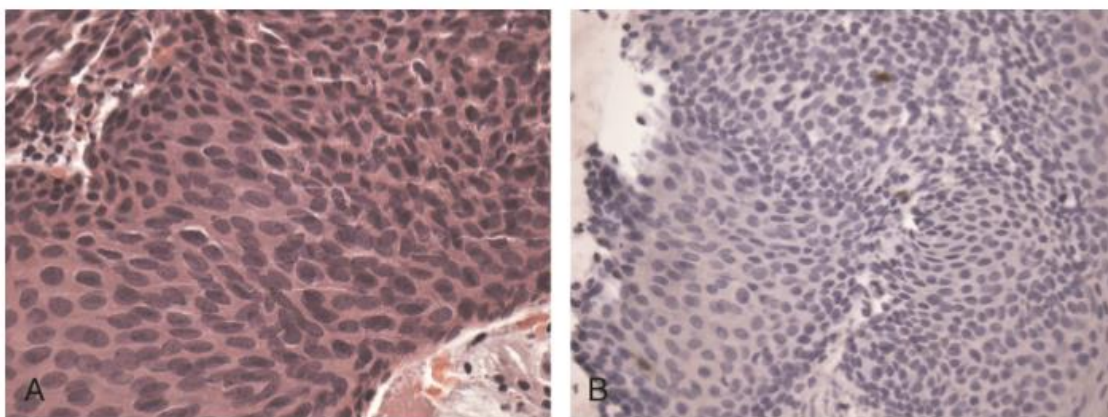


Figura 4. Mimetização de uma lesão de alto grau no epitélio escamoso. O epitélio mimetiza uma lesão pré-neoplásica na morfologia (A), mas a ausência de reatividade de p16 revela que não se trata de uma lesão de alto grau (B). A e B, grande aumento. Fonte: Darragh *et al.*, 2012³.

4.2.3 História Natural

O câncer do colo do útero é uma doença de evolução lenta, de aproximadamente 20 anos entre a infecção pelo HPV e o surgimento da doença⁷, e apresenta lesões precursoras, conhecidas como lesões de alto grau ou NIC II e NIC III. A NIC I representa a manifestação morfológica da infecção transitória por HPV, com alta probabilidade de regressão e, por isso não é considerada como lesão precursora do câncer do colo uterino².

Já está claro que nem todas as lesões consideradas precursoras progridem para o câncer, mas ainda não sabemos qual lesão se torna maligna quando não tratada¹³.

Estudos prospectivos com lesões de NIC III são difíceis de realizar, pois implicam em um maior risco de progressão para câncer. Motamedi *et al.* (2015)⁴⁰ relatou persistência em 92,6% dos casos de NIC III e em 1,9% dos casos foi encontrado carcinoma na peça cirúrgica subsequente. No entanto, a mediana de tempo entre a biópsia e o espécime cirúrgico foi de apenas 8,9 semanas.

A taxa de regressão encontrada por estudos prospectivos com pacientes de NIC II foi em torno de 70% em até três anos de acompanhamento, enquanto que em 15 a 28% dessas pacientes houve persistência ou progressão da lesão por igual período^{8,41,42,43}.

Matsumoto *et al.* (2011)⁴⁴ observaram em seu estudo que 64% das pacientes com diagnóstico de NIC I regrediram ao final de dois anos de acompanhamento, enquanto que apenas 9,7% progrediu para NIC III em cinco anos, representando um risco de progressão de 2,15 vezes menor do que a lesão de NIC II.

4.2.4 Abordagem Clínica

O rastreamento do câncer do colo do útero é um processo de múltiplas etapas, com objetivo de identificar e tratar as lesões precursoras, prevenindo o câncer cervical, ou através do seu diagnóstico precoce implicando na redução da mortalidade por essa doença^{45,46}.

O método de rastreamento para as lesões intraepiteliais e câncer do colo do útero é o exame citopatológico, ou teste de Papanicolaou. Atualmente, as Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero preconizam a realização do exame de rastreio a cada três anos após dois resultados citológicos anuais negativos, para mulheres de 25 a 64 anos de idade com atividade sexual iniciada².

A conduta clínica depende do diagnóstico histopatológico da biópsia, que é considerado o padrão-ouro para a decisão clínica. Em caso de lesão de baixo grau (NIC I), a paciente deverá ser mantida em seguimento citológico. Em contrapartida, para as mulheres com diagnóstico histopatológico de lesão de alto grau (NIC II/III) é indicada a realização de procedimentos excisionais como forma de tratamento², pois tem como objetivo o diagnóstico dos casos de lesão invasiva não detectada na citologia, na colposcopia ou na biópsia e prevenção da sua progressão para o câncer cervical^{2,3}.

Apesar de o diagnóstico de NIC II ser classificado como uma lesão de alto grau, as Diretrizes preveem uma conduta específica para esses casos em mulheres jovens. Em mulheres de até 24 anos com diagnóstico de NIC II, é preferível adotar a conduta expectante com seguimento por meio de exames citopatológicos e colposcópicos semestrais por dois anos². A conduta

conservadora nesses casos se justifica, pois a NIC II em mulheres jovens tende a ter um comportamento evolutivo semelhante à lesão de baixo grau, com altas taxas de regressão⁸. Com isso, é possível diminuir a possibilidade de sobretratamento e, conseqüentemente, diminuir o risco de morbidade obstétrica e neonatal, como o parto prematuro, tendo em vista que a maior parte delas não tem prole constituída².

Resultados falso-positivos na avaliação histopatológica podem conduzir ao tratamento desnecessário, podendo gerar complicações obstétricas relevantes em mulheres jovens, enquanto que resultados falso-negativos podem levar ao adiamento do tratamento¹³. Os potenciais danos do sobretratamento de pré-câncer em comparação com o risco de desenvolver doença invasiva, se essas lesões não são tratadas, precisam ser equilibrados³. Por isso, novas formas de garantir a precisão e a confiabilidade do diagnóstico estão sendo estudadas.

4.3 Projeto LAST

O projeto denominado Terminologia das Lesões Escamosas do Trato Anogenital Inferior (LAST) foi publicado em 2012, pelo Colégio Americano de Patologistas e pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical com objetivo de avaliar a terminologia das lesões escamosas associadas a infecção por HPV do trato anogenital inferior, incluindo o colo do útero³.

O projeto foi composto por cinco grupos de trabalho que se dividiram entre os objetivos da publicação. O grupo de trabalho 4 ficou encarregado de avaliar o uso de marcadores moleculares em conjunto com a morfologia para avaliação de amostras do trato anogenital inferior, realizando uma revisão de

literatura para determinar se os biomarcadores disponíveis auxiliam as recomendações de terminologia propostas ou melhoram a confiabilidade e a reprodutibilidade do diagnóstico histopatológico³.

Tendo em vista a ampliação dos conhecimentos sobre a fisiopatologia da oncogênese cervical associada à infecção por HPV, a baixa reprodutibilidade interobservador da interpretação histopatológica, principalmente na categoria diagnóstica de NIC II, e a falta de consenso se NIC II seria ou não uma entidade biológica verdadeira, o projeto LAST propôs que as lesões intraepiteliais cervicais sejam classificadas em lesões de baixo e alto grau, adicionando o uso de biomarcadores específicos, como o p16⁴⁷.

A publicação sugere que a NIC II seja considerada como lesão intraepitelial escamosa de alto grau, se a marcação de p16 for positiva. Em contrapartida, amostras de NIC II e p16 negativas devem ser classificadas como lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau³ (Figura 5).

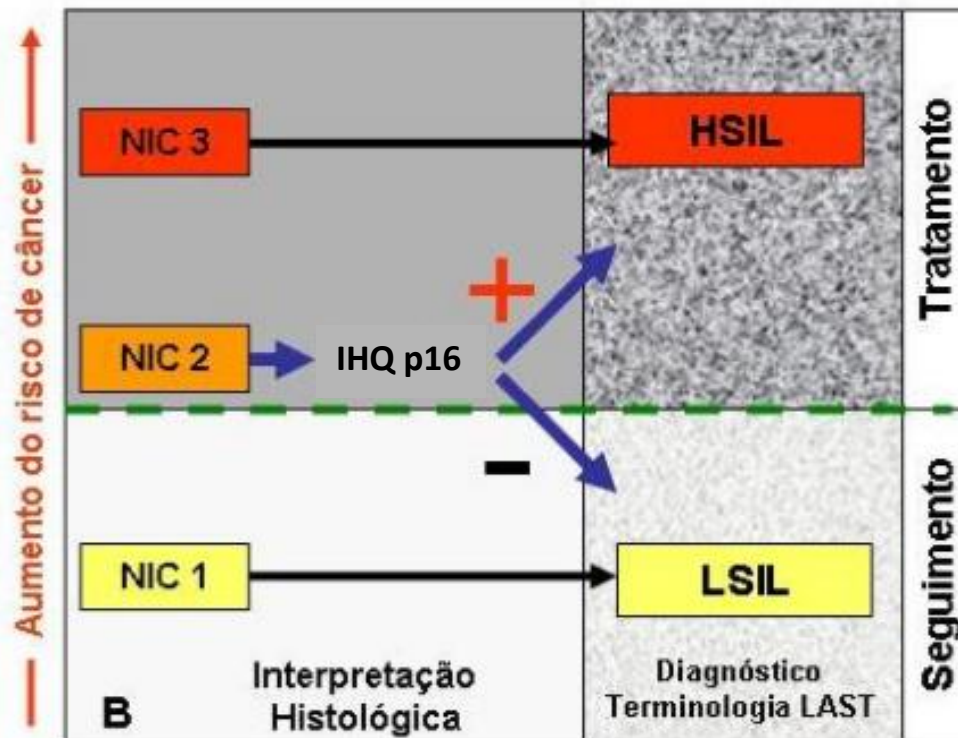


Figura 5. Esquema da LAST para uso de p16 para avaliar a categoria diagnóstica de NIC II. A LAST propõe que as amostras diagnosticadas como NIC II sejam avaliadas pela marcação imuno-histoquímica de p16, que se for positiva é considerada uma lesão de alto grau. Adaptado de: Darragh *et al.*, 2012³.

Segundo as recomendações da LAST, a marcação positiva para p16 é considerada como uma marcação de intensidade forte e padrão difuso em pelo menos um terço do epitélio escamoso. Marcações negativas e focais ou multifocais são consideradas negativas segundo a recomendação, favorecendo o diagnóstico de lesão de baixo grau³.

O uso do p16 visa esclarecer interpretações histológicas duvidosas entre as lesões de alto grau e as lesões de baixo grau. Por possuir uma nomenclatura dicotômica, a nova recomendação tem como intuito melhorar a acurácia e a

reprodutibilidade diagnóstica, principalmente nos diagnósticos de dúvida entre uma lesão pré-invasiva ou não⁴⁷.

Embora as mudanças nas estratégias de manejo clínico não sejam discutidas na LAST, a possibilidade de definir de forma mais precisa e reprodutível o risco de câncer de cada paciente com base no seu diagnóstico histopatológico levará a uma melhor atenção ao paciente³.

4.4 p16

O p16 é um gene supressor tumoral, cuja proteína regula a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular^{48,49}.

Durante a fase G1 do ciclo celular, CDK 4 e 6 formam complexos com a ciclina D1 que, por sua vez, fosforila a proteína retinoblastoma (Rb). A fosforilação da proteína Rb causa a liberação do fator de transcrição E2F do complexo Rb/E2F, iniciando a transcrição de genes requeridos na fase S do ciclo celular⁴⁸.

A p16 é uma proteína inibidora da CDK-4 e 6^{48,49}, impedindo a ligação da ciclina D1 e conseqüentemente, a fosforilação da proteína Rb. Dessa forma, o fator de transcrição E2F permanece associado a Rb, impedindo a transição da fase G1 para a fase S⁵⁰ (Figura 6).

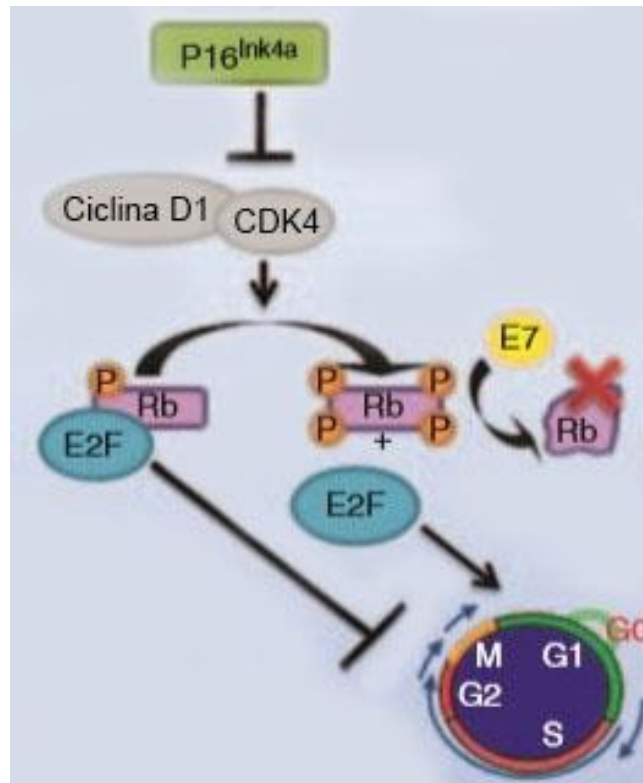


Figura 6. Papel de p16 e influência das oncoproteínas virais no ciclo celular. A p16 se liga a CDK-4 e 6, bloqueando a fosforilação de Rb e impedindo a progressão do ciclo celular. A oncoproteína viral E7 dos HPVs de alto risco inativam a proteína Rb, garantindo a liberação de E2F e a consequente progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Adaptado de: Romagosa *et al.*, 2011⁴⁹.

A infecção por HPV de alto risco induz a liberação de E2F através da inativação de Rb pela oncoproteína viral E7, impedindo a ação da p16^{INK4A} (Figura 6). Dessa forma, lesões associadas ao HPV são caracterizadas pela super expressão de p16, detectável pela marcação imuno-histoquímica (IHQ), já que não possui efeito sobre a ativação do ciclo celular, passando a ser acumulada no núcleo e citoplasma das células^{14,51} (Figura 7).

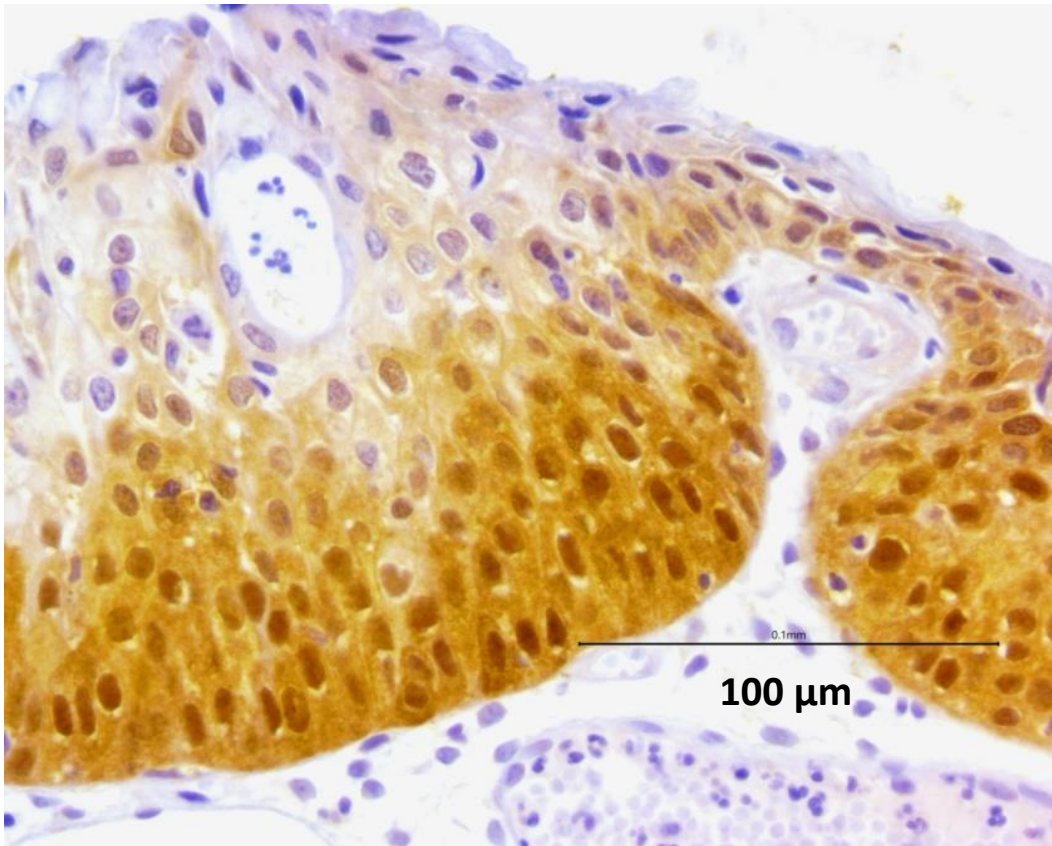


Figura 7. Marcação imuno-histoquímica de p16 em amostra de NIC II. A imagem histológica de biópsia diagnosticada como NIC II, pelo consenso de pelo menos dois patologistas, marcada por p16 apresenta marcação difusa nos dois terços inferiores do epitélio escamoso cervical. Fonte: SILVA, 2017⁵².

4.4.1 Utilidades clínicas do uso de p16

Além do uso do p16 ser sugerido pela recomendação LAST, o biomarcador imuno-histoquímico está sendo associado ao aumento da reprodutibilidade interobservador⁵³, a gravidade da lesão⁵⁴, a acurácia diagnóstica^{55,56} e a progressão da doença¹⁴.

Uma revisão sistemática e meta-análise reuniu cinco estudos sobre a concordância interobservador para a marcação de p16 e revelou que a adição do marcador imuno-histoquímico p16 na interpretação morfológica melhora a concordância entre os patologistas para o diagnóstico de NIC II ou mais⁵³.

Kanthiya *et al.* (2016)⁵⁴ demonstrou que a expressão de p16 está associada com a gravidade das lesões do colo do útero, apresentando maior expressão em diagnósticos de maior gravidade, como o carcinoma invasivo e NIC II/III, e menor expressão em lesões de menor gravidade, como a NIC I.

Bergeron *et al.* (2010)⁵⁵ relatou que a interpretação do p16 juntamente com interpretação morfológica na coloração de rotina (H&E) melhorou a acurácia diagnóstica da interpretação da biópsia, o que pode auxiliar nas decisões terapêuticas das pacientes com doença cervical.

Galgano *et al.* (2011)⁵⁶ mostrou que a marcação de p16 de intensidade forte e padrão difuso é altamente sensível para o diagnóstico de NIC II ou mais nas biópsias de colo uterino.

Em estudo recente, De Sam Lazaro *et al.* (2016)⁵⁷ mostrou que o uso de p16 diminui significativamente a frequência de produtos de tratamento excisionais negativos, sugerindo que estes casos foram desnecessariamente excisionados.

Miyamoto *et al.* (2016)⁴ concluiu em seu estudo que a expressão de p16 está fortemente associada com a progressão da doença em mulheres com diagnóstico de NIC II, apresentando diferença significativa na frequência da expressão positiva para p16 entre as lesões de NIC II que progrediram e as lesões que regrediram.

4.5 Ki-67

A proteína Ki-67 é uma proteína nuclear expressa durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), exceto em G0 e fase inicial de G1⁵⁴.

A infecção por HPV altera a regulação do controle da transição entre a fase G1 e a fase de síntese (S) pela degradação da proteína retinoblastoma (Rb)¹⁴. A infecção por HPV leva a um aumento da proliferação celular e o aumento da marcação para Ki-67 pode ser um indicador de infecção por HPV⁵⁴.

Embora a positividade de Ki-67 seja observada na camada basal do epitélio escamoso cervical em condições normais, a marcação nos terços médio e superior é indicativa de lesão intraepitelial⁵⁸ (Figura 8).

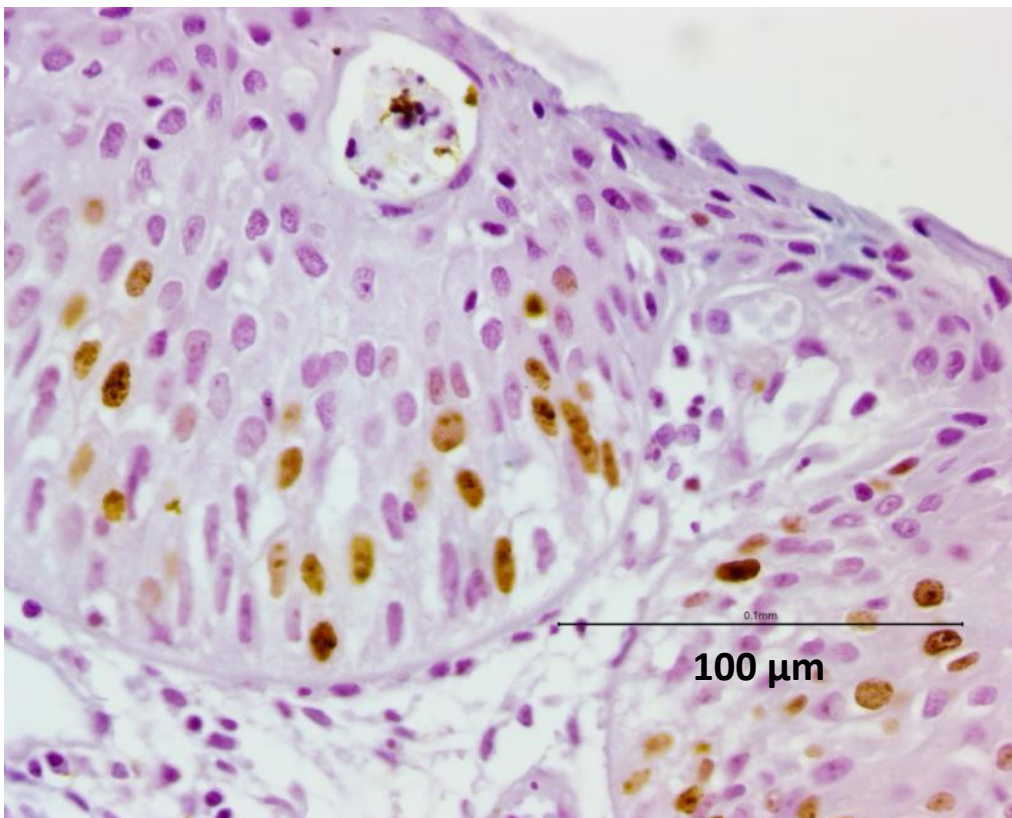


Figura 8. Marcação imuno-histoquímica de Ki-67 em amostra de NIC II. A imagem histológica de biópsia diagnosticada como NIC II, pelo consenso de pelo menos dois patologistas, marcada por Ki-67 apresenta marcação multifocal em até dois terços do epitélio escamoso cervical. Fonte: SILVA, 2017⁵².

4.5.1 Utilidades clínicas do uso de Ki-67

Embora o uso do Ki-67 não tenha sido sugerido pelas recomendações LAST, a análise da expressão de Ki-67 em amostras histológicas de biópsia de mulheres com diagnóstico de NIC II tem mostrado que Ki-67 está relacionado com o grau de NIC⁵⁴ e a progressão das lesões do colo uterino¹⁴.

Em estudo de Kanthiya *et al.* (2016)⁵⁴, a expressão de Ki-67 mostrou associação com a gravidade das lesões cervicais. Os diagnósticos de carcinoma invasivo e NIC II/III apresentaram maior expressão para o marcador, enquanto a categoria diagnóstica de NIC I apresentou menor expressão para Ki-67.

Miyamoto *et al.* (2016)¹⁴ encontrou diferenças significativas na frequência da expressão positiva de Ki-67 (em mais de 50% das células) nos casos que progrediram e regrediram, mostrando que a expressão de Ki-67 está associada com o desfecho em mulheres com biópsias de NIC II.

Estudo recente de Miralpeix *et al.* (2016)¹³ revela que casos que possuem expressão de Ki-67 em mais de 50% das células da biópsia de NIC II e presença de lesão de alto grau na citologia prévia tem um maior risco de NIC III subjacente na amostra, em comparação com as pacientes com Ki-67 negativo (menos de 50% das células marcadas), que devem se beneficiar do manejo conservador.

Capítulo 5 – Hipótese

Nossa hipótese é que a avaliação da expressão imuno-histoquímica de p16 e Ki-67 melhora o desempenho diagnóstico das biópsias cervicais com diagnóstico de NIC II para a identificação de lesões de alto grau nas peças cirúrgicas ou exames de seguimento clínico até um ano após a biópsia

Capítulo 6 – Materiais e métodos

Foi realizado estudo transversal com a inclusão de 104 casos de biópsias de colo uterino com diagnóstico de NIC II no período janeiro de 2006 a dezembro de 2016 diagnosticadas no DAPC do IFF.

Os casos identificados receberam numeração sequencial a fim de proteger a identidade do sujeito da pesquisa e foram submetidos à imunomarcção para p16^{INK4a} e Ki-67 para avaliação dos critérios de marcação imuno-histoquímica.

Informações clínicas como idade da paciente, diagnóstico citológico dos casos de acompanhamento e resultado das peças cirúrgicas provenientes do tratamento também foram coletados de registros médicos e consulta a prontuários.

6.1 Critérios de inclusão e exclusão

6.1.1 Critérios de inclusão

Casos de biópsias de colo uterino diagnosticados como NIC II na avaliação diagnóstica de rotina do DAPC do IFF com blocos disponíveis para recorte e dados de tratamento cirúrgico ou acompanhamento clínico.

6.1.2 Critérios de exclusão

Casos de biópsia de colo uterino que foram consideradas excisionais.

Casos de biópsia de colo uterino que não apresentaram a lesão original nas lâminas de imuno-histoquímica.

6.2 Imuno-histoquímica

Os recortes dos blocos contendo as biópsias de colo uterino foram feitos com espessura de 5µm e montados em lâminas silanizadas (HDAS003). Para menor índice de dobras, as lâminas foram deixadas *overnight* na estufa a 37°C.

No processo de desparafinização, as lâminas foram colocadas na estufa a 60°C por trinta minutos e mais cinco minutos em cada um dos dois banhos de xilol à temperatura ambiente. Logo após, foram hidratados em solução de etanol a 99% em dois banhos, seguidos por dois banhos de etanol a 95%, por cinco minutos cada. Ainda foram feitos dois banhos em água destilada por um minuto cada.

Foi utilizado o kit de sistema de detecção de polímero Novolink (Max Polymer Detection System, Leica) para a técnica de imuno-histoquímica nas etapas de bloqueio de peroxidase, bloqueio de proteína, anticorpo secundário, polímero e o cromógeno diaminobenzidina (DAB).

Para fins de inibição da peroxidase endógena, os cortes foram incubados com o bloqueio de peroxidase durante quinze minutos e, então, banhados em água destilada por um minuto para, depois, ser feita a recuperação antigênica em tampão de recuperação Trilogy (Cell Marque), por quarenta minutos a 96°C em banho-maria. Os cortes foram resfriados em água corrente na própria cuba com Trilogy por vinte minutos e, após, lavados em tampão fosfato-salino (do inglês, *phosphate buffered saline*, PBS) por um minuto.

Em seguida, para inibição das ligações inespecíficas, os cortes foram incubados com o bloqueio de proteína, na câmara úmida, em temperatura

ambiente, no período de quinze minutos. Foram também lavados em PBS por dois minutos cada um dos dois banhos.

Os cortes foram, então, incubados à temperatura ambiente com o anticorpo primário p16^{INK4a} (BD®; clone G175-405, monoclonal de camundongo) diluído em 1:100 e Ki-67 (Cell Marque®; clone SP6, monoclonal de coelho) diluído em 1:200 em solução diluidora (da Vinci Green, pH 7,3- BIOCARE) durante sessenta minutos em câmara úmida à temperatura ambiente.

Posteriormente os cortes foram lavados com PBS em dois banhos de dois minutos cada, seguidos pela incubação com o anticorpo secundário por trinta minutos e em seguida dois banhos de PBS por dois minutos cada.

Após a etapa com o anticorpo secundário, os cortes foram incubados com o sistema de detecção polímero por trinta minutos e posteriormente lavados em dois banhos de tampão PBS, por dois minutos cada. A marcação foi evidenciada com cromógeno DAB. Ao final desse processo, foi realizada a contracoloração com hematoxilina de Harris e montagem das lâminas com goma de Damar.

Para o controle de qualidade positivo da reação imuno-histoquímica, foram confeccionadas lâminas de *tissue microarray* (TMA) com casos sabidamente positivos para os anticorpos p16 e Ki-67, confeccionados de acordo com o método desenvolvido por Pires *et al.* (2006)⁵⁹. Para o controle de negativo da reação foi realizada a substituição do anticorpo primário por PBS.

Cerca de 60% das reações imuno-histoquímicas de p16 foram realizadas na Divisão de Patologia do INCA pelo método automatizado, utilizando como anticorpo primário o CINtec® p16 *Histology* (Ventana) diluído em 1:30 e incubado *overnight*.

6.3 Revisão das lâminas histológicas

As lâminas histológicas dos casos selecionados, coradas em H&E, foram revistas por três patologistas experientes do DAPC/IFF de forma independente e cega, ou seja, sem conhecimento do diagnóstico dos demais avaliadores, ou dos dados clínicos, achados colposcópicos ou citológicos das pacientes das quais foram obtidos os espécimes.

Na ficha de coleta de dados (vide apêndice A), os avaliadores classificaram a amostra em “não NIC”, NIC I, NIC II, NIC III e carcinoma. O diagnóstico final de cada caso foi definido através do consenso de pelo menos dois avaliadores. Em caso de discordância, os casos foram revistos em conjunto pelos três patologistas.

6.4. Avaliação das marcações imuno-histoquímicas

As lâminas de imuno-histoquímica foram avaliadas por três patologistas experientes, também de forma independente e cega. Os avaliadores foram orientados a avaliar as lâminas separadamente e na seguinte sequência: H&E, p16 e Ki-67.

Cada avaliador recebeu instruções impressas para a avaliação das lâminas de imuno-histoquímica (Vide apêndice B).

6.4.1 Critérios gerais de avaliação

Na ficha de coleta de dados, as marcações imuno-histoquímicas foram avaliadas considerando os seguintes critérios: localização (em terços de acometimento da espessura epitelial), distribuição e intensidade da marcação. O

avaliador assinalou como um terço (terço inferior), dois terços ou três terços de acordo com a localização da marcação imuno-histoquímica. A distribuição foi avaliada como focal, multifocal ou difusa. A marcação imuno-histoquímica foi considerada negativa, fraca, moderada ou acentuada para o parâmetro de intensidade.

6.4.2 Avaliação da marcação de p16

A marcação imuno-histoquímica de p16 foi classificada como positiva ou negativa, de acordo com as recomendações da LAST, que considera como marcação positiva para p16 os critérios de intensidade acentuada (forte), distribuição difusa (contínua) e em pelo menos um terço do epitélio. Marcações negativas, fracas e focais ou multifocais (irregular) são consideradas negativas (Figura 9). Se a amostra de NIC II for considerada positiva para a marcação de p16, o avaliador terá marcado a opção NIC II – HSIL e quando a marcação for considerada negativa terá assinalado a opção NIC II – LSIL, de acordo com a LAST.

O diagnóstico final de p16 foi definido pelo consenso de pelo menos dois patologistas independentes.

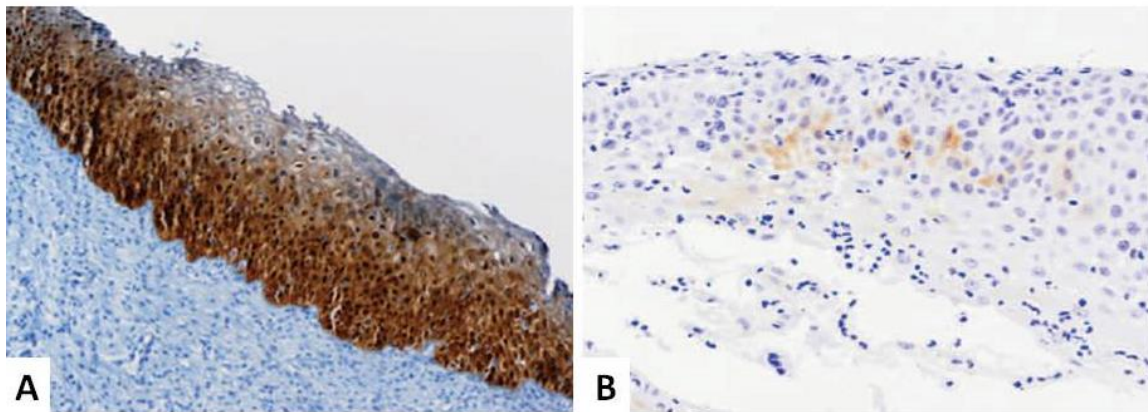


Figura 9. Padrão de marcação de p16. A marcação positiva para p16 apresenta intensidade forte, distribuição difusa e em dois terços do epitélio (A). A marcação fraca e focal ou multifocal foi considerada negativa (B). A e B, médio aumento. Fonte: Darragh *et al.*, 2012³.

6.4.3 Avaliação da marcação de Ki-67

A avaliação da marcação de Ki-67 foi realizada pelos patologistas através da quantificação de células marcadas pelo Ki-67 em cada terço do epitélio, utilizando os seguintes intervalos: 0, 1 – 10%, 11 – 25%, 26 – 50%, 51 – 75% e 75 – 100%. A quantificação deveria ser feita na área de maior gravidade da lesão.

O perfil da quantificação foi definido pelo consenso de pelo menos dois patologistas independentes para cada terço. Em caso de discordância, o perfil de marcação por terços foi definido pela média de quantificação estipulada pelos patologistas.

Os patologistas foram orientados a considerar a marcação imunohistoquímica de Ki-67 como positiva se houvesse mais de 50% de células marcadas e classificarem os casos de NIC II com esse percentual de marcação como NIC II – HSIL. Os casos de NIC II com menos de 50% de células positivas para o marcador Ki-67 foram considerados negativos e classificados como de NIC II – LSIL (Figura 10).

O diagnóstico final de Ki-67 foi definido pelo consenso de pelo menos dois patologistas independentes.

Para análise de associação com o padrão ouro e cálculos de acurácia diagnóstica, o *status* de Ki-67 foi considerado negativo quando diagnosticado como “não NIC”, NIC I e NIC II – LSIL e considerado positivo se diagnosticado como NIC II – HSIL e NIC III.

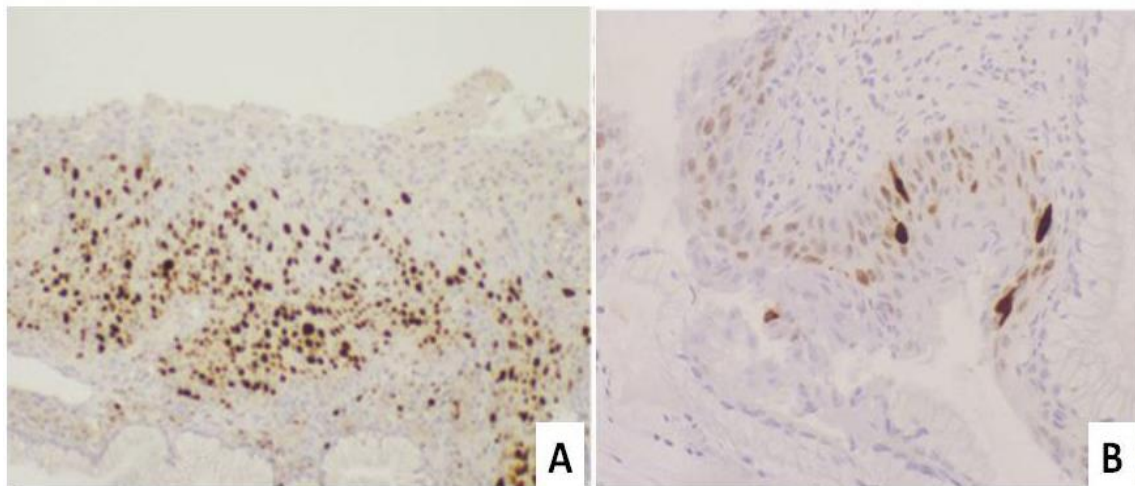


Figura 10. Padrão de marcação de Ki-67. A marcação de Ki-67 é considerada positiva se mais de 50% das células estiverem marcadas para Ki-67 (A) e considerada negativa se menos de 50% das células estiverem marcadas para Ki-67 (B). Fonte: Miralpeix *et al.*, 2016¹³.

6.5 Quantificação da marcação imuno-histoquímica de p16 e Ki-67

A marcação por p16 e Ki-67 foi avaliada por quantificação através de *software* ImageScope após digitalização das lâminas no *scanner* Aperio ScanScope CS5, que foi realizado na Divisão de Patologia (DIPAT) e no Banco Nacional de Tumores e DNA (BNT) do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA).

Foi utilizado o algoritmo “Positive Pixel Count v9” para p16 e o algoritmo “IHC Nuclear v1” para Ki-67 (Figura 11).

Foi considerada a partir de um terço (aproximadamente 33%) de marcação para p16 como uma marcação positiva, independentemente de sua intensidade, na quantificação digital. Para Ki-67 foi considerado como positiva a marcação em mais de 50% das células epiteliais, e como negativa a marcação inferior a 50% de células.

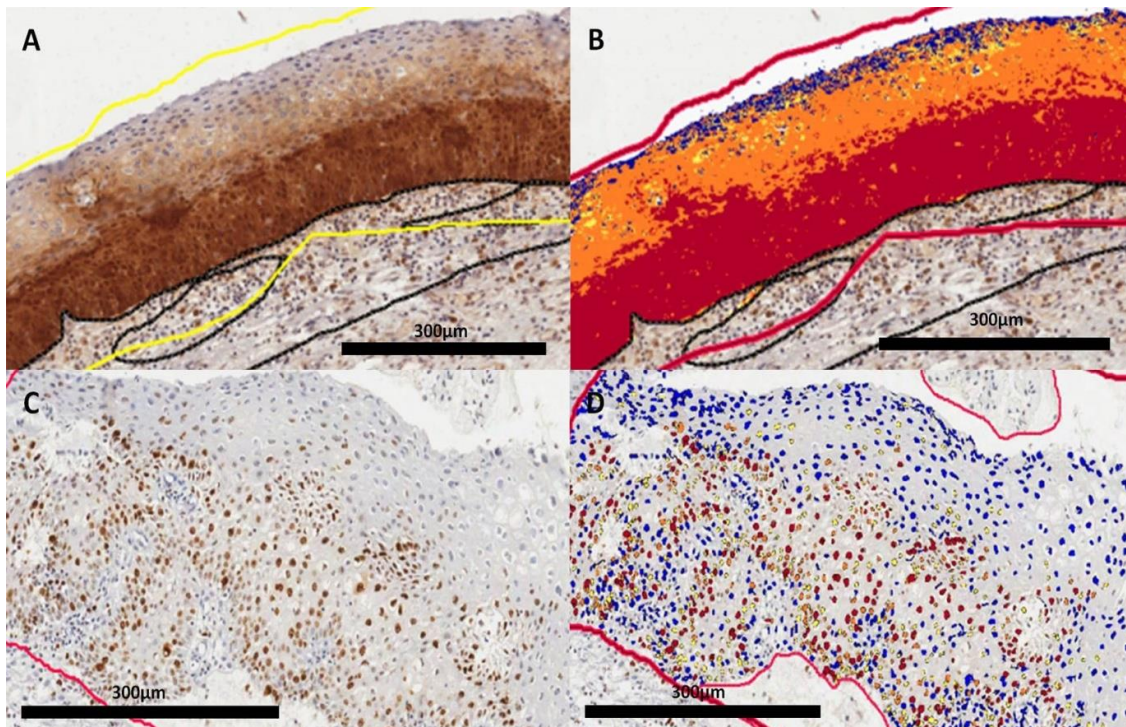


Figura 11. Quantificação das marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67. (A) Área de NIC II selecionada para a quantificação digital da marcação de p16. (B) Área de NIC II com a máscara de quantificação digital para p16, onde os pixels contabilizados na quantificação estão marcados pela máscara azul se negativo, amarelo se fracamente positivo, laranja se moderadamente positivo e vermelho se fortemente positivo. (C) Área de NIC II selecionada para a quantificação digital da marcação de Ki-67. (D) Área de NIC II com máscara de quantificação digital para Ki-67, onde os núcleos contabilizados na quantificação estão marcados pela máscara azul se negativo, amarelo se fracamente positivo, laranja se moderadamente positivo e vermelho se fortemente positivo.

6.6 Categorização do padrão-ouro

As informações clínicas e de seguimento foram obtidas por consulta de registros médicos e laudos de citologia e histologia emitidos pelo DAPC.

O padrão-ouro foi definido como o diagnóstico do procedimento excisional posterior à biópsia ou em novo diagnóstico histológico, colposcópico ou citológico de paciente mantida em seguimento (não tratada) após a biópsia, por ser jovem ou estar gestante, até um ano após esse procedimento.

Os diagnósticos de padrão ouro foram categorizados de quatro formas distintas. A classificação A compreende as categorias de negativo, NIC I, NIC II e NIC III. A classificação B categoriza como maior ou igual a NIC II (\geq NIC II), se for diagnosticado como NIC II, NIC III ou câncer, ou como menor ou igual a NIC I (\leq NIC I), se avaliado como negativo ou NIC I. A classificação C agrupa como \leq NIC I, os casos com padrão ouro de negativo e NIC I, separando os casos de NIC II e agrupando os casos de NIC III ou câncer, como maior ou igual a NIC III (\geq NIC III). A classificação D agrega as categorias diagnósticas de não NIC, NIC I e NIC II como menor ou igual a NIC II (\leq NIC II) e a categoria de NIC III ou câncer como maior ou igual a NIC III (\geq NIC III).

6.7 Análise estatística

Foram utilizados os índices Kappa ponderado para mensurar a concordância entre os avaliadores, excluindo a concordância ao acaso. Para avaliar a magnitude da concordância, foi utilizada a classificação proposta por Landis e Koch. Valores inferiores a zero indicam nenhuma concordância, entre zero e 0,20 uma concordância fraca, entre 0,21 e 0,40 razoável, de 0,41 a 0,60 moderada, entre 0,61 e 0,80 substancial e se o valor de Kappa for entre 0,81 a 1,00 tem-se uma concordância excelente.

O teste de Kruskal Wallis (KW) foi realizado para medir a significância estatística da associação entre variáveis contínuas e categóricas. O teste do qui

quadrado (χ^2) foi utilizado para verificar a associação entre variáveis categóricas. Para verificar a correlação entre duas formas de análise, avaliação dos patologistas e quantificação digital, utilizamos o teste de correlação de Spearman.

Cálculos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos foram realizados tendo como padrão ouro o diagnóstico da peça cirúrgica ou exames de seguimento após a biópsia.

As análises de concordância diagnóstica (Kappa), Kruskal Wallis, qui quadrado e teste de correlação de Spearman foram realizados no *software* SPSS e os cálculos de desempenho diagnóstico no *software* OpenEpi versão 3.01.

A significância estatística adotada nas análises foi de 0,05.

Capítulo 7 – Questões éticas

O presente estudo é um recorte do projeto “O valor da marcação imuno-histoquímica de p16, Ki-67, p21 e ciclina D1 para o diagnóstico das lesões intraepiteliais escamosas do colo uterino” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o protocolo de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 11542213.2.0000.5269 (vide anexo A).

A declaração de dispensa ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi emitido pelo Comitê de Ética da instituição, visto que o uso dos blocos de parafina não traria quaisquer danos à paciente cujo diagnóstico já foi estabelecido.

A coleta das informações sobre as peças cirúrgicas e o seguimento das mulheres não tratadas foi autorizada pela Área de Atenção Clínico-cirúrgica à Mulher do IFF/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

A identidade das pacientes das quais foram obtidos os espécimes histológicos foi mantida em sigilo.

Capítulo 8 – Resultados

8.1 Descrição da amostra

Foram identificados 187 casos de biópsia de colo uterino que receberam diagnóstico de NIC II no banco de dados do DAPC do IFF/Fiocruz no período de 2006 a 2016. No entanto, 41 casos não possuíam blocos de parafina disponíveis no DAPC, 28 casos foram provenientes de biópsia excisional, 10 pacientes não apresentaram exames posteriores à biópsia de NIC II (padrão ouro) e 4 casos não apresentaram a lesão original nas lâminas de imuno-histoquímica e, portanto, foram excluídos do estudo.

O total de 104 casos de biópsia com diagnóstico inicial de NIC II foram incluídos no estudo (Figura 12). A presente amostra apresentou uma idade média de 33,6 anos e mediana de 31,4 anos, com idade mínima de 16,7 anos e máxima de 79,1 anos.

Após a avaliação dos casos selecionados, o consenso dos patologistas revisores reclassificou dois casos como “não NIC” (1,9%), dez casos como NIC I (9,6%) e dez casos como NIC III (9,6%). 78,9% dos casos permaneceram com o diagnóstico de NIC II após a reavaliação das lâminas de H&E pelos patologistas. Nenhum caso foi reavaliado como carcinoma na referida amostra.

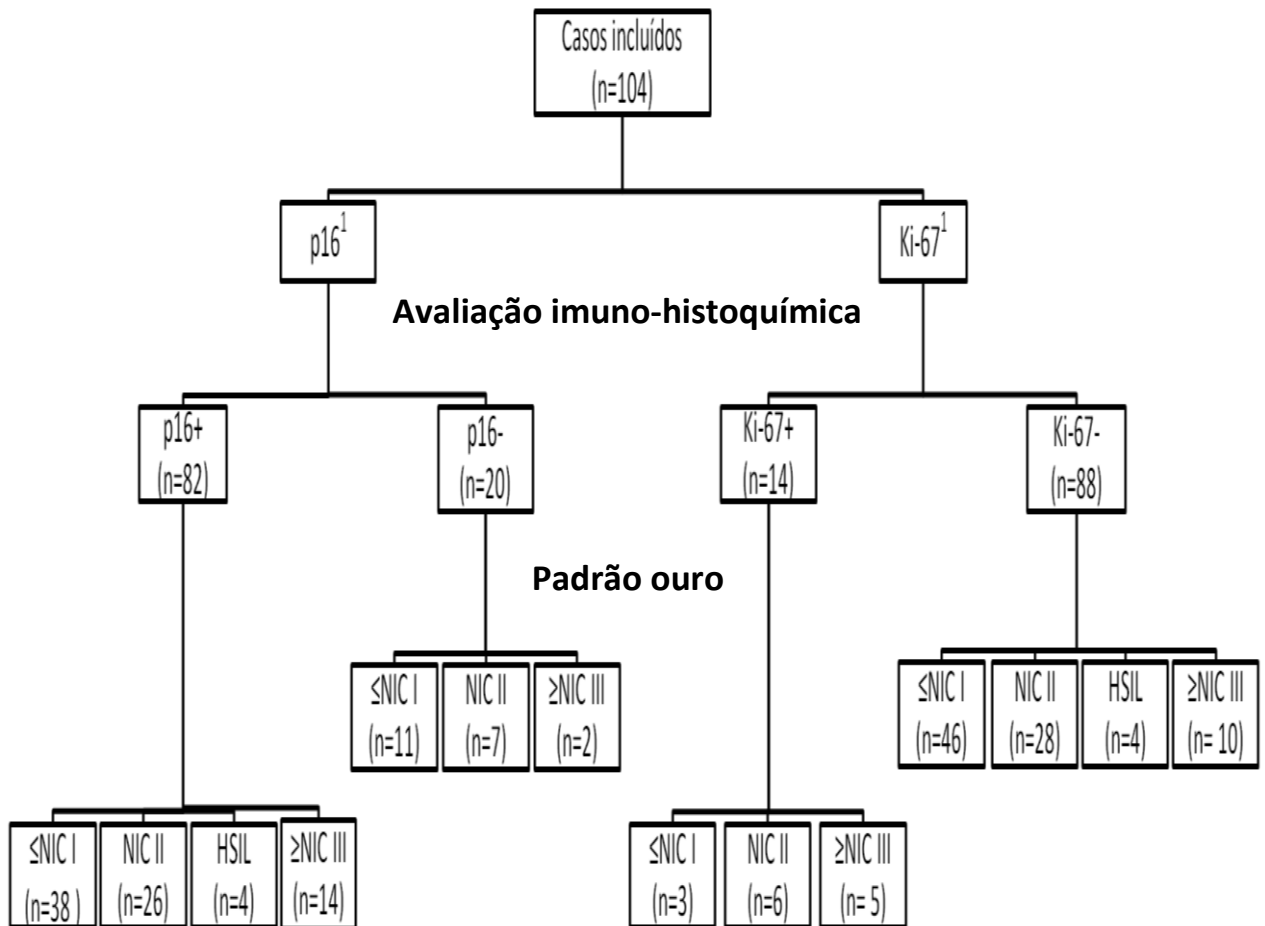


Figura 12. Fluxograma de casos incluídos no estudo. O fluxograma apresenta o número de casos incluídos no estudo, e a distribuição dos casos de acordo com o resultado da avaliação dos biomarcadores pelo *status* consolidado e pelos diagnósticos de padrão ouro. ¹ Dois casos não foram considerados na exposição do fluxograma pela pouca representatividade da lesão, inviabilizando sua avaliação.

8.2 Concordância interobservador

A concordância interobservador para o diagnóstico de H&E e para os diagnósticos realizados com auxílio das marcações imuno-histoquímicas, considerando a avaliação simultânea dos três patologistas, é apresentada na Tabela 1. A classificação dicotômica da LAST obteve uma concordância excelente, enquanto que as demais, que possuíam cinco categorias, atingiram concordância substancial.

Tabela 1. Concordância interobservador para o diagnóstico de H&E e imunomarcações.

Coloração/ imunomarcação	Concordância interobservador (κ)^a
Classificação histológica (H&E)	0,630
Classificação histológica (p16)	0,775
LAST	0,887
Classificação histológica (Ki-67)	0,700

K= Kappa; H&E= Hematoxilina e eosina; LAST= *The Lower Anogenital Squamous Terminology*.

^aConcordância interobservador considerando a avaliação simultânea dos três patologistas.

8.3 Avaliação das marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67

A Figura 13 apresenta a coloração de H&E e as marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67 para cada categoria diagnóstica utilizada no estudo (“não NIC”, NIC I, NIC II – LSIL, NIC II – HSIL e NIC III) de acordo com o consenso do grupo revisor.

Na Tabela 2 é apresentada a distribuição dos casos por categoria diagnóstica na avaliação da coloração de H&E, marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67 e na classificação LAST realizada pelo consenso dos patologistas. Na classificação histológica realizada com auxílio de p16 a maior parte dos casos foi avaliada como NIC II – HSIL (68,3%) e como HSIL (81,5%) na classificação da LAST. A classificação histológica utilizando Ki-67 classificou 63,1% dos casos como NIC II – LSIL.

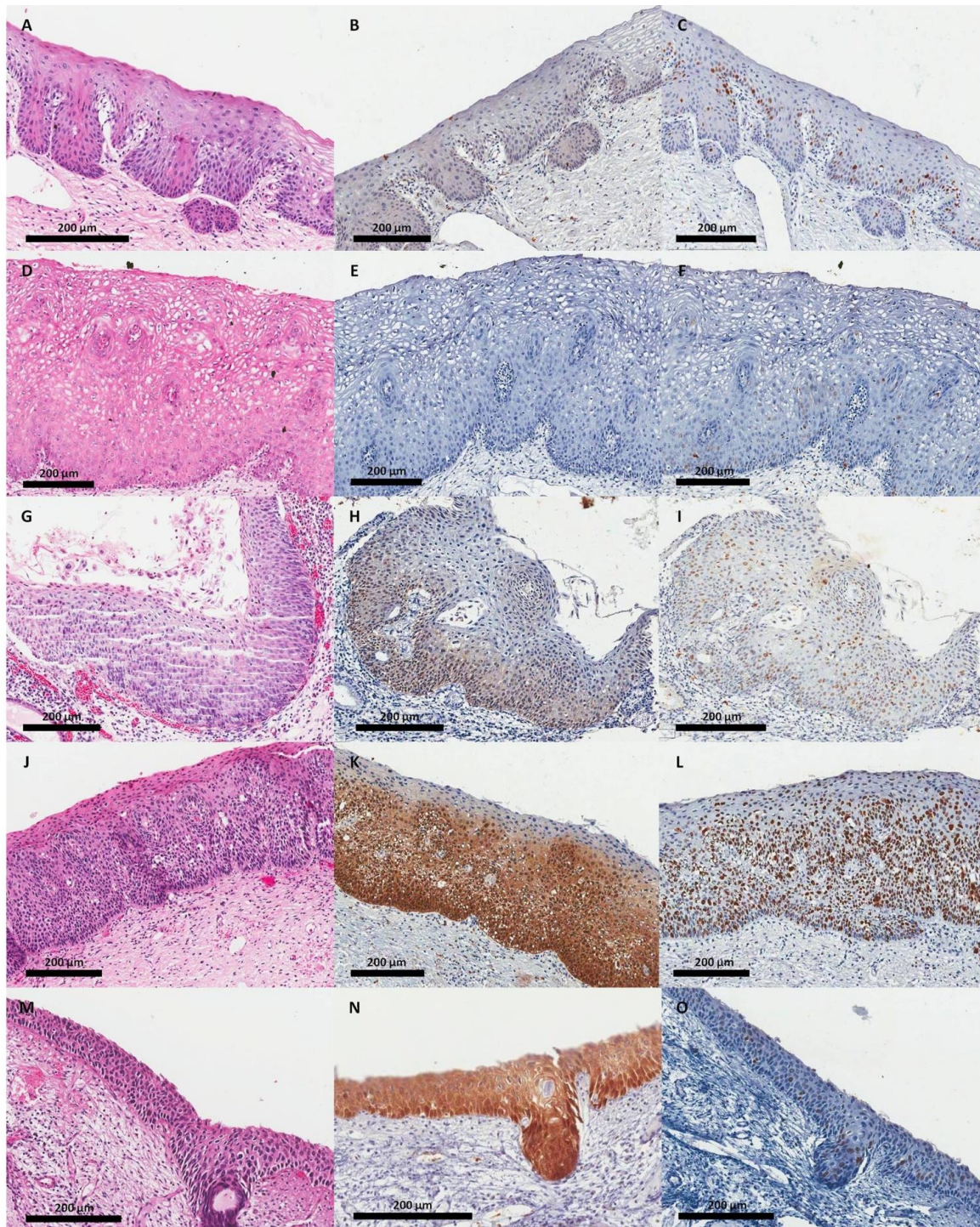


Figura 13. Categorias diagnósticas definidas pelo consenso do grupo revisor. Imagens representativas na coloração de H&E (A, D, G, J, M) e imunomarcações de p16 (B, E, H, K, N) e Ki-67 (C, F, I, L, O) para as categorias diagnósticas de não NIC (A – C), NIC I (D – F), NIC II – LSIL (G – I), NIC II – HSIL (J – L) e NIC III (M – O).

Tabela 2. Distribuição dos casos por categoria diagnóstica.

Categorias diagnósticas^a	H&E	p16	Ki-67^b
Classificação histológica			
Não NIC	2 (1,9%)	4 (3,8%)	5 (4,9%)
NIC I	10 (9,6%)	10 (9,6%)	9 (8,7%)
NIC II	82 (78,9%)	-	-
NIC II – LSIL	-	9 (8,7%)	65 (63,1%)
NIC II – HSIL	-	71 (68,3%)	14 (13,6%)
NIC III	10 (9,6%)	10 (9,6%)	10 (9,7%)
LAST^b			
LSIL	-	19 (18,5%)	-
HSIL	-	84 (81,5%)	-

^a O consenso dos patologistas foi utilizado para esta análise. ^b Um caso de “amostra não diagnóstica” não foi considerado na análise. NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. LSIL: *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*. HSIL: *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*. LAST: *The Lower Anogenital Squamous Terminology*. H&E: hematoxilina e eosina.

8.4 Quantificação digital das marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67

As categorias diagnósticas utilizadas na avaliação das lâminas de H&E foram comparadas com a quantificação digital da marcação imuno-histoquímica de p16 e Ki-67. A Tabela 3 apresenta o nível de significância para cada variável de quantificação em relação às categorias diagnósticas da avaliação da coloração de H&E. Entre as categorias diagnósticas das biópsias na coloração de H&E foi observada diferença significativa entre as medianas das variáveis de marcação total, forte, moderada, intensidade forte e moderada agrupada e negativa de p16 obtidas pela quantificação digital. Na avaliação de Ki-67, a mediana de marcação total não diferiu entre as categorias diagnósticas na avaliação da coloração de H&E.

Tabela 3. Nível de significância observado nas comparações das variáveis de quantificação entre os diagnósticos da biópsia na coloração de H&E.

Imunomarcacão	Variável de quantificação	p-valor^a
p16	Marcação total (%)	0,006
	Marcação forte (%)	0,010
	Marcação moderada (%)	0,013
	Marcação forte e moderada (%)	0,003
	Marcação fraca (%)	0,103
	Marcação negativa (%)	0,001
	Total de pixels (n)	0,581
	Área (mm²)	0,954
Ki-67	Marcação total (%)	0,623

^a Teste de Kruskal-Wallis: $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. mm²: milímetros quadrados.

A média de marcação de p16 foi de 68,9% ($\pm 32,1$) da quantidade total de pixels analisados pelo *software* de quantificação digital. A área média quantificada foi de 0,526 mm², o equivalente a 2.442.634 pixels, com área mínima de quantificação de 0,029 mm² (120.867 pixels) e máxima de 5,935 mm² (23.973.290 pixels).

A marcação positiva total, marcação forte, moderada, forte e moderada, fraca e negativa, obtidas através da quantificação digital, foram diferentes ($p < 0,001$) entre as categorias diagnósticas de p16, tanto na classificação histológica quanto na LAST. Apenas as variáveis de número de pixels e o tamanho da área não apresentaram diferença nas classificações utilizadas (Tabela 4).

Tabela 4. Estatística descritiva e comparações entre o resultado da quantificação digital de imagem e as categorias diagnósticas de p16

p16	Média ± DP	Mínimo	Máximo	Classificação histológica ^a	LAST ^a
				p-valor ^b	
Marcação positiva total (%)	68,944 ± 32,056	0,040	98,942	<0,001	<0,001
Marcação forte (%)	17,314 ± 15,076	0,001	59,620	<0,001	<0,001
Marcação moderada (%)	45,185 ± 22,108	0,013	79,956	<0,001	<0,001
Marcação forte e moderada (%)	62,498 ± 29,595	0,016	95,377	<0,001	<0,001
Marcação fraca (%)	6,446 ± 4,810	0,007	26,154	<0,001	<0,001
Marcação negativa (%)	31,056 ± 32,056	1,057	99,959	<0,001	<0,001
Total de pixels (n)	2.442.634 ± 3.203.458	120.867	23.973.290	0,133	0,316
Área (mm²)	0,52622 ± 0,664	0,029	5,935	0,912	0,750

^a Considerando o diagnóstico de consenso na avaliação dos patologistas. ^b Teste de Kruskal-Wallis: $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. mm²: milímetros quadrados; DP: desvio padrão. LAST: *The Lower Anogenital Squamous Terminology*.

A Tabela 5 descreve a média e o desvio padrão das variáveis de quantificação digital de p16 por categoria diagnóstica de p16. Nota-se um predomínio de marcação forte a moderada nas lesões de NIC II - HSIL e NIC III (HSIL na classificação LAST), enquanto que nas categorias não NIC, NIC I e NIC II - LSIL (LSIL na classificação LAST) predominou a marcação negativa.

Tabela 5. Perfil de marcação nas categorias diagnósticas na marcação de p16.

Classificação de p16	Marcação total ^a	Marcação forte ^a	Marcação moderada ^a	Marcação forte e moderada ^a	Marcação fraca ^a	Marcação negativa ^a
Classificação histológica						
Não NIC	6,6% ± 5,7	0,3% ± 0,5	5,4% ± 4,8	5,7% ± 5,2	0,9% ± 0,7	93,4% ± 5,7
NIC I	30,1% ± 33,1	4,2% ± 7,0	21,3% ± 24,6	25,5% ± 30,5	4,7% ± 3,6	69,9% ± 33,1
NIC II – LSIL	19,0% ± 24,9	1,1% ± 1,7	15,2% ± 20,5	16,3% ± 21,7	2,7% ± 4,6	80,9% ± 24,9
NIC II – HSIL	80,7% ± 18,7	21,2% ± 14,1	52,4% ± 14,9	73,6% ± 17,2	7,2% ± 4,7	19,3% ± 18,7
NIC III	90,1% ± 7,6	22,9% ± 16,2	58,7% ± 9,5	81,6% ± 8,6	8,5% ± 4,3	9,9% ± 7,6
LAST^b						
LSIL	13,9% ± 18,4	0,7% ± 1,3	10,7% ± 15,2	11,5% ± 16,1	2,5% ± 3,6	86,0% ± 18,4
HSIL	81,5% ± 17,9	21,1% ± 14,2	53,1% ± 14,4	74,2% ± 16,6	7,4% ± 4,6	18,5% ± 17,9

^a Média do percentual de marcação e desvio padrão (média ± DP). NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. LAST: *The Lower Anogenital Squamous Terminology*. LSIL: *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*. HSIL: *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*.

Os patologistas revisores não observaram diferença entre o método manual e o automatizado das reações imuno-histoquímicas para p16.

A marcação média de Ki-67 foi de 21,4% (±14,004%) dos núcleos contabilizados pelo *software* de quantificação, cuja média foi de 3.384,08 núcleos contados, com quantidade mínima de 158 núcleos e máxima de 29.038 núcleos. A marcação positiva total de Ki-67 foi significativamente diferente entre as categorias diagnósticas de Ki-67 ($p < 0,001$).

A Tabela 6 evidencia que o percentual de núcleos positivos para Ki-67 foi maior nas categorias diagnósticas de maior gravidade, NIC II – HSIL e NIC III.

Tabela 6. Perfil de marcação das categorias diagnósticas na marcação de Ki-67.

Classificação de Ki-67^a	Marcação total^b
Não NIC	15,8% ± 7,7
NIC I	21,1% ± 13,2
NIC II – LSIL	17,3% ± 10,7
NIC II – HSIL	36,6% ± 15,1
NIC III	29,3% ± 17,7

^a O consenso dos patologistas foi utilizado para esta análise. ^b Média ± desvio padrão. DP: desvio padrão. NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. LSIL: *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*. HSIL: *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*.

8.5 Status de p16 e Ki-67: consenso do grupo revisor versus quantificação digital de imagem

A Tabela 7 apresenta a distribuição dos casos entre o status de p16 e a quantificação digital. Observamos que 88,2% dos casos negativos pela quantificação foram também indicados como negativos pelos patologistas e que 96,5% dos casos positivos pela quantificação foram apontados como positivo pelos avaliadores. Foi verificada associação entre as duas formas de avaliação ($X^2=69,942$; $p<0,001$).

Tabela 7. Distribuição do status de p16 entre a quantificação digital e o consenso do grupo revisor.

Consenso	Quantificação digital		Total^a
	Negativo	Positivo	
Negativo	15 (88,2%)	3 (3,5%)	18
Positivo	2 (11,8%)	82 (96,5%)	84
Total	17 (100%)	85 (100%)	102

^a Dois casos foram excluídos do estudo pela pouca representatividade da lesão, inviabilizando a avaliação desses casos.

A Figura 14 ilustra as divergências encontradas na avaliação de p16. Os casos classificados como negativos pelo consenso de patologistas e positivos pela quantificação digital apresentaram marcação fraca, apesar de distribuição difusa em pelo menos um terço do epitélio, o que não atendeu aos critérios de positividade estabelecidos pela LAST. Os casos avaliados como positivos pelo consenso dos patologistas e negativos pela quantificação digital também não atendiam aos critérios de positividade (marcação difusa em pelo menos um terço do epitélio).

Os casos discordantes foram revistos e os resultados dos dois métodos de avaliação confrontados para definição do *status* de p16. Todos os casos discordantes foram considerados negativos para p16 após a revisão. No total, 20 (19,6%) casos foram classificados como negativos e 82 (80,4%) casos como positivos para a marcação imuno-histoquímica de p16.

A distribuição do *status* da marcação imuno-histoquímica de Ki-67 pelo consenso e a categorização dos resultados de quantificação digital para o mesmo marcador está descrita na Tabela 8. Verificamos que 79,4% dos casos classificados como negativo pela quantificação digital também foram avaliados como negativo pelo consenso dos patologistas e 80% dos casos positivos na quantificação também foram classificados dessa forma pelo grupo revisor. O teste do qui-quadrado demonstrou que existe associação entre as duas formas de avaliação ($X^2=9,318$; $p=0,002$).

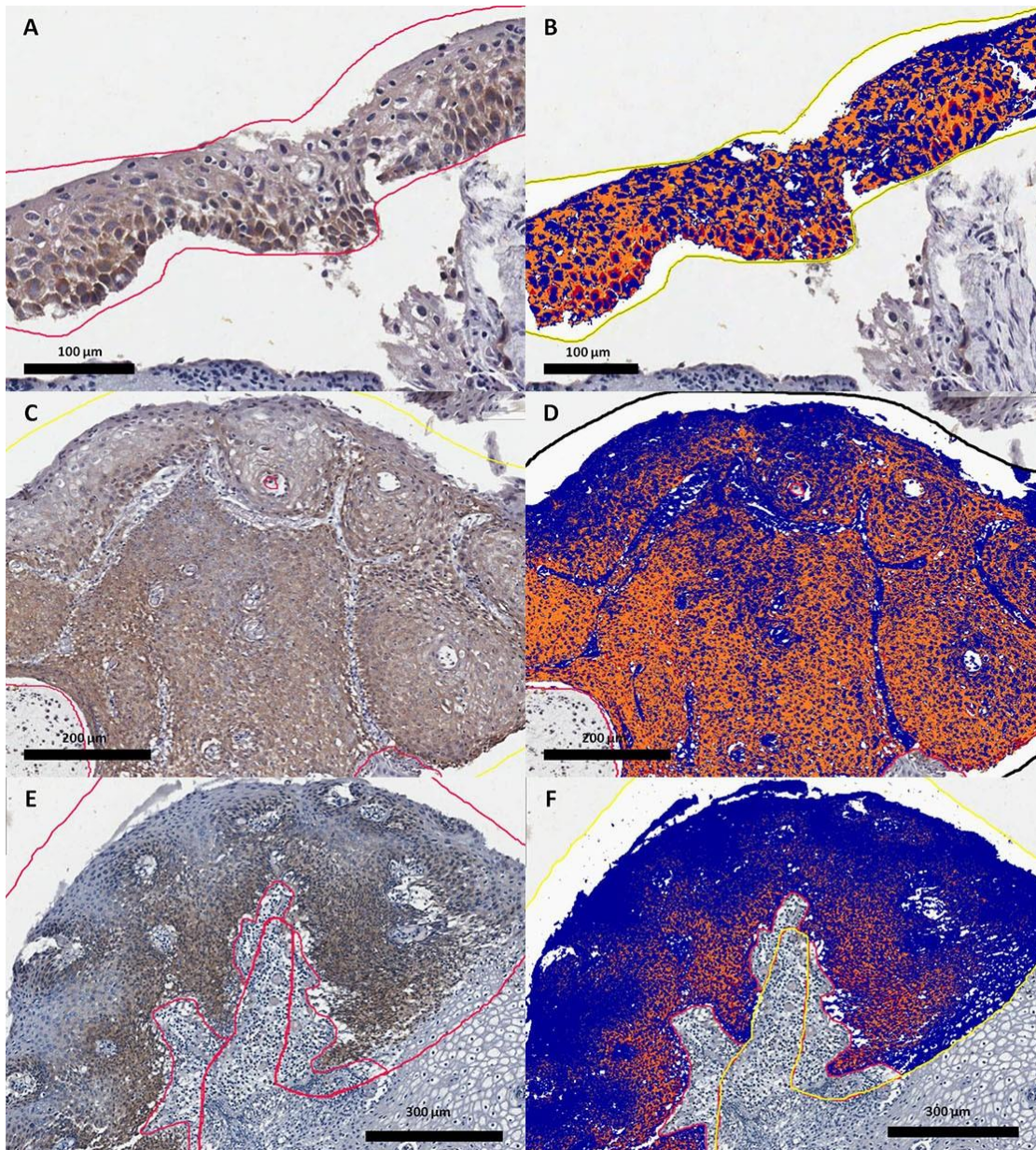


Figura 14. Ilustração dos casos divergentes entre o consenso do grupo revisor e o resultado da quantificação digital de imagem na avaliação de p16. As imagens A – D foram classificadas como negativas na avaliação dos patologistas e positivas na quantificação digital. As imagens E e F foram positivas pelo consenso dos avaliadores e negativas pela quantificação digital. (A) A biópsia apresenta um padrão de marcação fraco e difuso, o que foi considerado negativo, de acordo com os critérios da LAST. (B) A máscara de quantificação digital mostra a predominância da marcação moderada (laranja) no epitélio cervical, mas não consegue distinguir o padrão difuso do multifocal. (C) Lesão papilomatosa em área tangencial com marcação moderada, não sendo possível a avaliação dos terços. (D) Lesão em área tangencial com predomínio de marcação moderada (laranja) em contraste com a marcação negativa (azul), na área não tangencial a marcação não era difusa e também não predominava a marcação moderada, sendo classificada como negativa. (E) Apesar da marcação ser predominantemente multifocal, a morfologia de HSIL influenciou na avaliação dos patologistas. (F) A máscara de quantificação digital demonstra predomínio da marcação negativa (azul), com percentual inferior a 33% de marcação moderada (laranja), sendo esse caso considerado negativo.

Tabela 8. Distribuição da classificação de Ki-67 entre a quantificação digital e o consenso do grupo revisor.

Consenso	Quantificação digital		Total ^a
	Negativo	Positivo	
Negativo	77 (79,4%)	1 (20,0%)	78
Positivo	20 (20,6%)	4 (80,0%)	24
Total	97 (100%)	5 (100%)	102

^a Dois casos foram excluídos do estudo pela pouca representatividade da lesão, inviabilizando a quantificação digital.

A Figura 15 exemplifica a discordância entre a avaliação de Ki-67 pelo consenso do grupo revisor e pela quantificação digital. O caso que foi avaliado como negativo pelo consenso e positivo pela quantificação digital foi prejudicado por falhas relacionadas à realização da técnica de imuno-histoquímica (marcação inespecífica difusa). Os casos classificados como positivos pelo consenso e negativos pela quantificação digital foram ocasionados por problemas pré-analíticos (dobra – 5%; artefato diatérmico – 15%; imprecisão da quantificação visual – 10%; contra coloração intensa com hematoxilina – 20%; corte tangencial – 5%), analítico (má aplicação do ponto de corte – 10%) e pós-analítico (categorização inadequada das amostras classificadas como NIC III em positivas para Ki-67 – 35%).

Após a revisão dos casos discordantes entre os dois métodos de avaliação da imunomarcação de Ki-67, 11 casos discordantes foram considerados negativos e 10 casos como positivos. No total, 88 (86,3%) casos foram classificados como negativos e 14 (13,7%) como positivos.

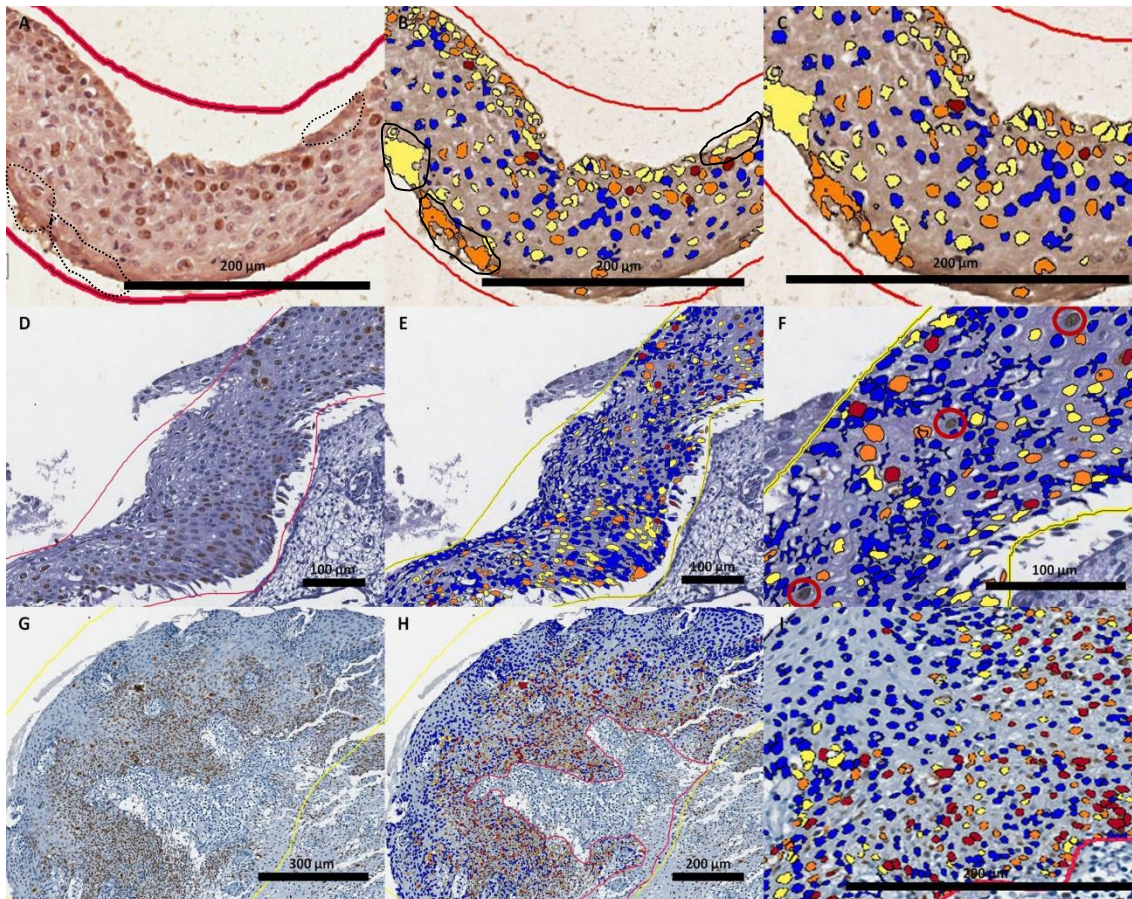


Figura 15. Ilustração dos casos divergentes entre o consenso do grupo revisor e o resultado da quantificação digital de imagem na avaliação de Ki-67. As imagens A - C foram classificadas como negativa na avaliação dos patologistas e positiva na quantificação digital. As imagens D - I foram positivas pelo consenso dos avaliadores e negativas pela quantificação digital. (A) A amostra histológica apresentou fundo proveniente de DAB, evidenciando a falha na técnica de imuno-histoquímica, que levou a superestimação da marcação na quantificação digital. (B e C) A máscara de quantificação digital mostra células áreas de fundo (área tracejada preta), sendo contabilizadas como núcleos positivos (área circundada por linha contínua preta). (D) Amostra apresentando pouco contraste entre a contracoloração com hematoxilina e a marcação imuno-histoquímica de Ki-67. (E e F) A máscara de quantificação digital mostra predomínio da marcação negativa (azul). Núcleos positivos não foram contabilizados pelo *software* de quantificação digital (círculos vermelhos). (G) O consenso de patologistas considerou como marcação de Ki-67 positiva, viés ocasionado por corte tangencial. (H e I) O *software* de quantificação digital classificou a amostra como negativa, realizando a análise da marcação total presente na área selecionada da amostra.

O teste de Spearman mostrou correlação ($p=0,729$; $p<0,001$) entre a quantificação digital da marcação imuno-histoquímica de Ki-67 e sua quantificação por terços realizada pelos patologistas.

8.6 Associação da marcação imuno-histoquímica de p16 e Ki-67 e o diagnóstico padrão ouro

O estudo contou com 24 casos (23,1%) com padrão ouro “não NIC” (idade mediana de 24,5 anos), 25 casos (24,0%) com NIC I (idade mediana de 36,9 anos), 34 casos (32,7%) com NIC II (idade mediana de 29,6 anos), 17 casos (16,4%) com NIC III (idade mediana de 38,1 anos) e 4 casos (3,8%) com HSIL (idade mediana de 29,1 anos).

A Tabela 9 apresenta a distribuição do diagnóstico de H&E obtido através do consenso do grupo revisor em relação ao diagnóstico padrão ouro. Ressalta-se que apenas 32,9% dos casos diagnosticados como NIC II após revisão dos patologistas foi confirmado pelo diagnóstico padrão ouro.

Tabela 9. Distribuição do consenso do grupo revisor na coloração de H&E em relação ao padrão ouro.

Categorias diagnósticas	Padrão ouro					Total
	Não NIC	NIC I	NIC II	NIC III	HSIL	
Não NIC	1 (4,2%)	1 (4,0%)	0	0	0	2
NIC I	2 (8,3%)	2 (8,0%)	5 (14,7%)	1 (5,9%)	0	10
NIC II	18 (75,0%)	21 (84,0%)	27 (79,4%)	13 (76,5%)	3 (75,0%)	82
NIC III	3 (12,5%)	1 (4,0%)	2 (5,9%)	3 (17,6%)	1 (25,0%)	10
Total	24 (100%)	25 (100%)	34 (100%)	17 (100%)	4 (100%)	104

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. HSIL: *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*.

A distribuição entre o *status* de p16 e o diagnóstico de padrão ouro pode ser observada na Tabela 10, ressaltando que para todos os diagnósticos de padrão ouro a maior parte dos casos teve a marcação de p16 considerada positiva em todos os métodos de avaliação.

Não foi verificada associação entre a marcação de p16 e padrão ouro em nenhuma das categorizações de padrão ouro testadas.

Tabela 10. Distribuição do *status* de p16 em relação ao padrão ouro.

Avaliação	Categorias diagnósticas	Padrão ouro				
		Não NIC	NIC I	NIC II	NIC III	HSIL
Consenso do grupo revisor ^a	Negativo	7 (29,2%)	3 (12,0%)	7 (21,2%)	2 (11,8%)	0
	Positivo	17 (70,8%)	22 (88,0%)	26 (78,8%)	15 (88,2%)	4 (100%)
Quantificação digital de imagem ^b	Negativo	6 (25,0%)	3 (12,0%)	7 (20,6%)	2 (12,5%)	0
	Positivo	18 (75,0%)	22 (88,0%)	27 (79,4%)	14 (87,5%)	4 (100%)
<i>Status</i> consolidado ^c	Negativo	8 (33,3%)	3 (12,0%)	7 (21,2%)	2 (12,5%)	0
	Positivo	16 (66,7%)	22 (88,0%)	26 (78,8%)	14 (87,5%)	4 (100%)

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. HSIL: *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*. ^a Um caso foi excluído da análise por ter sido classificado como “não diagnóstico” pelo consenso dos patologistas. ^b Um caso foi excluído do estudo pela pouca representatividade da lesão, inviabilizando a quantificação digital. ^c Dois casos foram excluídos do estudo pela pouca representatividade da lesão, inviabilizando a avaliação desses casos.

A distribuição entre o *status* de Ki-67 e o diagnóstico de padrão ouro pode ser observada na Tabela 11, ressaltando que para todos os diagnósticos de padrão ouro a maior parte dos casos teve a marcação de Ki-67 considerada negativa pelos três métodos de avaliação.

Foi verificada associação entre a marcação de Ki-67 e o padrão ouro apenas na categorização de \leq NIC I e \geq NIC II (classificação B) quando a marcação de Ki-67 foi definida pelo consenso dos patologistas ($X^2=4,250$; $p=0,039$).

Ao avaliar a associação entre o *status* consolidado de Ki-67 e o diagnóstico padrão ouro foi verificada associação significativa na classificação B

(\leq NIC I e \geq NIC II; $X^2=4,603$; $p=0,031$), classificação C (\leq NIC I, NIC II e \geq NIC III; $X^2=7,424$; $p=0,024$) e classificação D (\leq NIC II e \geq NIC III; $X^2=5,247$; $p=0,021$).

Tabela 11. Distribuição do *status* de Ki-67 em relação ao padrão ouro.

Avaliação	Categorias diagnósticas	Padrão ouro				
		Não NIC	NIC I	NIC II	NIC III	HSIL
Consenso do grupo revisor ^a	Negativo	21 (87,5%)	21 (84,0%)	24 (70,6%)	10 (62,5%)	3 (75,0%)
	Positivo	3 (12,5%)	4 (16,0%)	10 (29,4%)	6 (37,5%)	1 (25,0%)
Quantificação digital de imagem ^b	Negativo	23 (95,8%)	24 (96,0%)	33 (97,1%)	13 (86,7%)	4 (100%)
	Positivo	1 (4,2%)	1 (4,0%)	1 (2,9%)	2 (13,3%)	0
<i>Status</i> consolidado ^b	Negativo	24 (100%)	22 (88,0%)	28 (82,4%)	10 (66,7%)	4 (100%)
	Positivo	0	3 (12,0%)	6 (17,6%)	5 (33,3%)	0

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. HSIL: *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*. ^a Um caso foi excluído da análise por ter sido classificado como “não diagnóstico” pelo consenso dos patologistas. ^b Dois casos foram excluídos do estudo pela pouca representatividade da lesão, inviabilizando a quantificação digital.

A Tabela 12 mostra a distribuição da porcentagem de marcação de Ki-67 nos terços do epitélio em relação ao diagnóstico de padrão ouro. É possível observar que a marcação no terceiro terço não é frequentemente descrita nos casos cujo padrão ouro foi “não NIC”, NIC I e NIC II. Enquanto que metade dos casos com padrão ouro de NIC III obteve algum percentual de marcação no terceiro terço do epitélio.

A marcação de 1 – 25% de células para Ki-67 predominou no primeiro (44,7%) e no segundo terço (37,9%) do epitélio, enquanto que no terceiro terço do epitélio não houve marcação para 66,9% dos casos.

Não foi verificada associação entre a distribuição da marcação de Ki-67 nos terços do epitélio com o diagnóstico de padrão ouro em nenhuma das classificações de padrão ouro testadas.

Tabela 12. Distribuição da porcentagem de marcação de Ki-67 nos terços em relação ao padrão ouro

Terços do epitélio	Porcentagem de marcação	Padrão ouro ^a					Total
		Não NIC	NIC I	NIC II	NIC III	HSIL	
Primeiro terço	0	0	0	0	0	0	0
	1 – 10%	3 (12,5%)	4 (16,0%)	5 (14,7%)	2 (12,5%)	0	14 (13,5%)
	11 – 25%	10 (41,7%)	16 (64,0%)	11 (32,4%)	6 (37,5%)	3 (75,0%)	46 (44,7%)
	26 – 50%	9 (37,5%)	4 (16,0%)	12 (35,3%)	5 (31,3%)	1 (25,0%)	31 (30,1%)
	51 – 75%	2 (8,3%)	1 (4,0%)	3 (8,8%)	2 (12,5%)	0	8 (7,8%)
	76 – 100%	0	0	3 (8,8%)	1 (6,2%)	0	4 (3,9%)
	Total^b		2 (25,0%)	3 (37,5%)	2 (25,0%)	1 (12,5%)	0
Segundo terço	0	2 (8,3%)	3 (12,0%)	2 (5,9%)	1 (6,3%)	0	8 (7,8%)
	1 – 10%	12 (50,0%)	11 (44,0%)	12 (35,3%)	2 (12,5%)	1 (25,0%)	38 (36,9%)
	11 – 25%	9 (37,5%)	9 (36,0%)	12 (35,3%)	7 (43,7%)	2 (50,0%)	39 (37,9%)
	26 – 50%	0	2 (8,0%)	5 (14,7%)	4 (25,0%)	1 (25,0%)	12 (11,7%)
	51 – 75%	1 (4,2%)	0	2 (5,9%)	2 (12,5%)	0	5 (4,8%)
	76 – 100%	0	0	1 (2,9%)	0	0	1 (0,9%)
	Total^b		15 (24,6%)	14 (22,9%)	23 (37,7%)	7 (11,5%)	2 (3,3%)
Terceiro terço	0	17 (70,8%)	17 (68,0%)	25 (73,5%)	8 (50,0%)	2 (50,0%)	69 (66,9%)
	1 – 10%	7 (29,2%)	8 (32,0%)	8 (23,5%)	5 (31,3%)	2 (50,0%)	30 (29,1%)
	11 – 25%	0	0	0	2 (12,5%)	0	2 (2,0%)
	26 – 50%	0	0	1 (3,0%)	1 (6,2%)	0	2 (2,0%)
	51 – 75%	0	0	0	0	0	0
	76 – 100%	0	0	0	0	0	0
	Total^b		7 (20,6%)	8 (23,5%)	9 (26,5%)	8 (23,5%)	2 (5,9%)

^a Um caso foi excluído da análise por ter sido classificado como “não diagnóstico” pelo consenso dos patologistas. ^b Total de casos com marcação até o primeiro terço (1/3), segundo terço (2/3) e terceiro terço (3/3). Neoplasia Intraepitelial Cervical. HSIL: *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*.

8.7 Desempenho diagnóstico das marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67

A Tabela 13 apresenta as medidas de desempenho diagnóstico da avaliação da coloração de H&E e do *status* da marcação imuno-histoquímica de p16 e Ki-67 para o padrão ouro de \leq NIC I e \geq NIC II. A avaliação do diagnóstico de consenso do grupo revisor na coloração de H&E apresentou alta sensibilidade, porém baixa especificidade. A avaliação de p16 demonstrou alta sensibilidade e baixa especificidade, enquanto que a avaliação de Ki-67 demonstrou baixa sensibilidade e alta especificidade.

Tabela 13. Avaliação de desempenho diagnóstico na avaliação da coloração de H&E e do *status* da marcação imuno-histoquímica para o padrão ouro de \leq NIC I e \geq NIC II.

Teste	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
H&E				
Consenso	89,09% (78,17-94,9)	12,24% (5,735 – 24,24)	53,26%	50%
p16				
Consenso	83,33% (71,26 - 90,98)	20,41% (11,48 - 33,64)	53,57%	52,63%
Quantificação digital de imagem	83,33% (71,26 – 90,98)	18,37% (9,976 - 31,36)	52,94%	50,00%
Status consolidado	83,02% (70,77 – 90,8)	22,45% (13,02 - 35,88)	53,66%	55,00%
Ki-67				
Consenso	31,48% (20,68 – 44,74)	85,71% (73,33 - 92,90)	70,837%	53,16%
Quantificação digital de imagem	5,66% (1,944 – 15,37)	95,92% (86,29 - 98,87)	60,0%	48,45%
Status consolidado	20,75% (12,00 – 33,46)	93,88% (83,48 – 97,9)	78,57%	52,27%

VPP: valor preditivo positivo. VPN: valor preditivo negativo.

O desempenho diagnóstico da coloração de H&E e das marcações imuno-histoquímicas também foi avaliado para o padrão ouro de \leq NIC II e \geq NIC III. A avaliação do diagnóstico de consenso do grupo revisor na coloração de H&E apresentou baixa sensibilidade e alta especificidade. A avaliação da marcação de p16 apresentou alta sensibilidade e baixa especificidade e Ki-67 obteve baixa sensibilidade e alta especificidade, assim como na categorização de padrão ouro anterior (\geq NIC II) (Tabela 14).

Tabela 14. Avaliação de desempenho diagnóstico na avaliação da coloração de H&E e das marcações imuno-histoquímicas para o padrão ouro de \leq NIC II e \geq NIC III.

Teste	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
H&E				
Consenso	17,65% (6,191 – 41,03)	92,77% (85,11 – 96,65)	33,33%	84,62%
p16				
Consenso	88,24% (65,66 – 96,71)	20,73% (13,37 – 30,72)	18,75%	89,47%
Quantificação digital	87,5% (63,98 – 96,5)	19,28% (12,23 – 29,04)	17,28%	88,89%
Status consolidado	87,5% (63,98 – 96,5)	21,95% (14,35 – 32,05)	17,95%	90%
Ki-67				
Consenso	37,5% (18,48 – 61,36)	79,52% (69,62 – 86,8)	26,09%	86,84%
Quantificação digital	13,33% (3,736 – 37,88)	96,39% (89,9 – 98,76)	40,0%	86,02%
Status consolidado	33,33% (15,18 – 58,29)	89,16% (80,66 – 94,19)	35,71%	88,1%

VPP: valor preditivo positivo. VPN: valor preditivo negativo.

Ao agrupar o *status* da marcação de p16 e Ki-67 obtidos através da consolidação dos resultados das análises de quantificação digital e consenso do grupo revisor, notamos predomínio da combinação em que a expressão de p16 foi classificada como positiva e o *status* de Ki-67 como negativo, sendo

encontrado em maior frequência nos casos com padrão ouro de NIC II. A expressão positiva para ambos marcadores imuno-histoquímicos também foi predominante nos casos com diagnóstico padrão ouro de NIC II. O diagnóstico de padrão ouro “não NIC” obteve maior frequência de *status* negativo para p16 e Ki-67 (Tabela 15).

Tabela 15. Combinação do *status* de p16 e Ki-67 em relação ao padrão ouro na avaliação do *status* consolidado.

Status da marcação	Padrão ouro					Total^a
	Não NIC	NIC I	NIC II	NIC III	HSIL	
p16+/ Ki-67+	0	3 (25,0%)	6 (50,0%)	3 (25,0%)	0	12 (100%)
p16-/ Ki-67-	8 (44,4%)	3 (16,7%)	7 (38,9%)	0	0	18 (100%)
p16+/ Ki-67-	16 (23,2%)	19 (27,5%)	20 (28,9%)	10 (14,5%)	4 (5,8%)	69 (100%)
p16-/ Ki-67+	0	0	0	2 (100%)	0	2 (100%)
Total	24	25	33	15	4	101

^a Três casos foram excluídos do estudo pela pouca representatividade da lesão, inviabilizando a quantificação digital.

8.8 Impacto clínico da aplicação das recomendações LAST para p16 e o ponto de corte de Ki-67.

Em nossa amostra, 31 casos (29,8%) fizeram acompanhamento clínico, cuja idade mediana foi de 25,3 anos e tempo de acompanhamento de 291 dias para esse grupo, enquanto que 73 casos (70,2%) sofreram algum tipo de tratamento, apresentando 33,7 anos como idade mediana e tempo entre a biópsia e o tratamento de 106 dias.

A maior parte da amostra teve o padrão ouro definido pelo diagnóstico de peça cirúrgica (68,3%), seguido de exames de colposcopia (17,3%), citologia (10,6%), biópsia e histerectomia (ambas em 1,9% dos casos).

A Tabela 16 expõe a distribuição da conduta aplicada à paciente em relação às categorias diagnósticas do padrão ouro. Ressalta-se que 75% dos casos negativos foram acompanhados clinicamente, no entanto 64% dos casos com padrão ouro de NIC I foram submetidos a procedimento excisional. Em contrapartida, quase a totalidade dos casos de NIC II e NIC III foram submetidos a tratamento (97,1% e 100%, respectivamente).

Foi verificada associação entre a conduta aplicada e o diagnóstico de padrão ouro nas três classificações utilizadas: classificação A ($X^2=46,739$; $p<0,001$), classificação B ($X^2=28,333$; $p<0,001$) e classificação C ($X^2=37,837$; $p<0,001$).

Tabela 16. Distribuição da conduta aplicada a paciente em relação ao padrão ouro.

Conduta	Padrão ouro					Total
	Negativo	NIC I	NIC II	NIC III	HSIL	
Seguimento	18 (58,1%)	9 (29,0%)	1 (3,2%)	0	3 (9,7%)	31 (100%)
Tratamento	6 (8,2%)	16 (21,9%)	33 (45,2%)	17 (23,3%)	1 (1,4%)	73 (100%)
Total	24	25	34	17	4	104

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. HSIL: *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*.

De acordo com o diagnóstico de padrão ouro, vinte e dois casos foram sobretratados. Se as recomendações LAST fossem aplicadas na rotina clínica para a definição de conduta, o sobretratamento teria sido evitado em 27,3% (6/22) dos casos, havendo subtratamento em 11,8% (Tabela 17).

Por outro lado, ao avaliarmos o grupo das pacientes seguidas, ao agruparmos o diagnóstico de NIC II como HSIL por causa da positividade da p16, levaríamos ao tratamento desnecessário (sobretratamento) de 87,5%

(21/24). Apenas um caso que realizou seguimento clínico obteve diagnóstico padrão ouro de NIC II e foi considerado negativo para p16. Todos os casos com diagnóstico padrão ouro de HSIL seriam reconhecidos pela LAST como positivos para p16 e, portanto, lesão de alto grau (Tabela 17).

Tabela 17. Classificação LAST e status de p16 em relação do padrão ouro de acordo com a conduta clínica.

Conduta	p16	LAST	Padrão ouro					Total
			Não NIC	NIC I	NIC II	NIC III	HSIL	
Seguimento	-	LSIL	5 (20,8%)	1 (4,0%)	1 (3,0%)	0	0	7
	+	HSIL	13 (54,2%)	8 (32,0%)	0	0	3 (75,0%)	24
Tratamento	-	LSIL	3 (12,5%)	3 (12,0%)	8 (23,5%)	2 (11,8%)	0	16
	+	HSIL	3 (12,5%)	13 (52,0%)	25 (73,5%)	15 (88,2%)	1 (25,0%)	57
Total			24 (100%)	25 (100%)	34 (100%)	17 (100%)	4 (100%)	104

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. LSIL: *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*. HSIL: *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*.

O ponto de corte utilizado para a avaliação de Ki-67, utilizando o status consolidado para a análise, evitaria o sobretratamento de 90,9% dos casos sobretratados pela rotina clínica, persistindo o sobretratamento em 9,1% dos casos, havendo subtratamento em 66,7% (Tabela 18).

Apenas um caso que realizou seguimento clínico obteve diagnóstico padrão ouro de NIC II, considerado negativo para Ki-67. Em contrapartida, apenas um caso que seguiu em acompanhamento clínico foi considerado positivo na avaliação e obteve diagnóstico de padrão ouro de NIC I. Todos os casos com diagnóstico padrão ouro de HSIL foram considerados negativos para Ki-67 (Tabela 18).

Tabela 18. Status de Ki-67 consolidado em relação do padrão ouro de acordo com a conduta clínica.

Conduta	Classificação de Ki-67	Padrão ouro					Total ^a
		Não NIC	NIC I	NIC II	NIC III	HSIL	
Seguimento	Negativo	18 (75,0%)	8 (32,0%)	1 (2,9%)	0	3 (75,0%)	30
	Positivo	0	1 (4,0%)	0	0	0	1
Tratamento	Negativo	6 (25,0%)	14 (56,0%)	27 (79,4%)	10 (66,7%)	1 (25,0%)	58
	Positivo	0	2 (8,0%)	6 (17,7%)	5 (33,3%)	0	13
Total		24 (100%)	25 (100%)	34 (100%)	15 (100%)	4 (100%)	102

^a Dois casos foram excluídos do estudo pela pouca representatividade da lesão, inviabilizando a quantificação digital. NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical. LSIL: *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*. HSIL: *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*.

Capítulo 9 – Discussão

O presente estudo visou compreender a contribuição da expressão de p16 e Ki-67 para o diagnóstico de NIC II, bem como a aplicabilidade clínica das recomendações LAST para p16 e do ponto de corte em 50% para a expressão de Ki-67.

Destaca-se que a faixa etária da presente amostra (idade mediana de 31,4 anos) representa a faixa etária acometida pelo câncer do colo do útero e é alvo das recomendações para o seu rastreamento. No entanto, a distribuição de idade apresentada pelo grupo estudado (idade mínima de 16,7 anos e máxima de 79,1 anos) retratou o rastreamento realizado nas pacientes que procuram os serviços de saúde de forma espontânea. As Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero preconizam o rastreio citológico em mulheres com idade entre 25 a 64 anos, com atividade sexual iniciada².

A concordância diagnóstica substancial na coloração de rotina (H&E) apresentada pelo grupo revisor nesse estudo foi superior à concordância encontrada por estudos anteriores para NIC II^{39,60,61,62}, que variou entre fraca e moderada.

A avaliação por três patologistas independentes e cegos para informações clínicas foi realizada para diminuir a possibilidade de viés de aferição decorrente da subjetividade da interpretação diagnóstica. No presente estudo, todas as classificações diagnósticas utilizadas resultaram em uma concordância substancial, tendo a classificação LAST uma excelente concordância diagnóstica.

Como era de se esperar, a reprodutibilidade das recomendações LAST, classificando a biópsia com diagnóstico inicial de NIC II em positiva ou negativa, apresentou concordância excelente, visto que se trata de uma classificação dicotômica, enquanto as demais classificações foram constituídas por cinco categorias diagnósticas.

Todavia, o aumento da concordância diagnóstica não é devido apenas às diferenças de quantidade de categorias diagnósticas por classificação, outro fator é a avaliação do p16. Essa hipótese foi testada em estudo anterior⁵² onde uma avaliação dicotômica na coloração do H&E em \leq NIC I e \geq NIC II e de p16 no mesmo corte apresentaram o mesmo perfil que o nosso estudo, onde essa classificação com H&E foi substancial (0,787) e com p16 excelente (0,81). Maniar *et al.* (2015)⁴⁷ também encontrou alta concordância (substancial) utilizando as recomendações LAST para a positividade de p16.

A distribuição das categorias diagnósticas após a reavaliação do grupo revisor demonstrou que os diagnósticos originais de NIC II nessas biópsias estavam corretos em 78,9% dos casos. Castle *et al* (2007)¹¹ encontrou proporção inferior (43,4%) de concordância entre a interpretação das biópsias de NIC II por patologistas de um centro clínico e a avaliação por um grupo de patologistas para controle de qualidade das biópsias cervicais. Em estudo de base populacional, Carreon *et al.* (2007)⁶³ relatou que dois patologistas revisores do Instituto Nacional do Câncer da Costa Rica concordaram em apenas 13% e 31% dos diagnósticos de NIC II das biópsias encaminhadas para revisão.

O bom desempenho observado no nosso estudo pode ser explicado, em parte, pelo fato de os patologistas revisores fazerem parte do grupo que diagnosticou as biópsias originalmente como NIC II e, portanto, com tendência a

reproduzir os diagnósticos anteriores, além da ampla experiência em patologia ginecológica que pode resultar em melhor desempenho e, portanto, maior concordância interobservador. Além disso, nossa amostra foi composta por um grupo homogêneo de biópsias com diagnóstico original de NIC II, circunstância conhecida pelos avaliadores, que pode ter gerado tendência ao diagnóstico de NIC II em casos de interpretação morfológica duvidosa.

Ambos os biomarcadores tiveram uma distribuição diagnóstica semelhante ao consenso da avaliação da coloração de H&E, ressaltando que a quantidade de casos interpretados como NIC III não variou entre as diferentes formas de interpretação, por este ser um diagnóstico morfológico. O efeito mais frequente do uso dos marcadores foi a diminuição da graduação diagnóstica, mais acentuada na utilização do marcador Ki-67.

Embora a concordância interobservador tenha se mantido substancial na avaliação das marcações imuno-histoquímicas de p16 e Ki-67 em nosso estudo, ambos os biomarcadores apresentaram aumento da concordância em relação à coloração de rotina, sugerindo que a técnica de imuno-histoquímica seria uma ferramenta capaz de melhorar a reprodutibilidade do diagnóstico. No entanto, o desenho do presente estudo não é adequado para transpor os resultados para a realidade diagnóstica por causa do predomínio de casos com diagnóstico de NIC II.

Os dados da literatura sobre esses dois marcadores são diferentes e, por isso, podemos interpretar os dados de forma distinta. Em relação ao p16 tendemos a julgar que sua utilização melhora a reprodutibilidade diagnóstica, especialmente quando o mesmo foi empregado no contexto da LAST, ou seja, para classificar NIC II como LSIL e HSIL.

Estudos anteriores com desenhos mais adequados para análise da concordância diagnóstica já demonstraram uma significativa melhora na concordância diagnóstica com a utilização de p16^{53,55,64,65,66,67}. Apenas o estudo de Pacchiarotti *et al* (2014)⁶⁸, que comparou a reprodutibilidade diagnóstica na coloração de rotina e na marcação de p16, não observou melhora significativa na concordância. O Kappa por ele apresentado na coloração de rotina já era substancial, tendo como avaliadores um grupo de patologistas experientes, cenário semelhante ao nosso.

Em outro estudo realizado no DAPC/IFF foi observado aumento da concordância interobservador com a avaliação da marcação imuno-histoquímica de p16 ao categorizar o diagnóstico em NIC I- e NIC II+, enquanto que para Ki-67 não houve melhora na concordância diagnóstica. Ao avaliar a categoria de NIC II isolada das demais, ambos os biomarcadores não foram capazes de melhorar significativamente a concordância diagnóstica⁵², o que ocorreu de forma semelhante no presente estudo.

Não existe consenso sobre o ponto de corte para a expressão positiva de Ki-67 na literatura, mas optamos pelo ponto de 50% por sua associação com desfecho de NIC III ou câncer mostrada em estudos anteriores^{13,14}. Apesar de ter sido definido um ponto de corte específico para a expressão positiva de Ki-67, foi observada certa resistência à utilização do método pelos patologistas, tendendo à classificação de biópsias de NIC II como positivas com marcação em torno de 30% e presença de marcação para Ki-67 nos dois terços superficiais, explicando sua menor reprodutibilidade em relação ao p16⁶⁹.

O predomínio de amostras positivas para p16 era esperado, pois NIC II, apesar do comportamento biológico incerto, ainda é considerado como HSIL na

classificação de citológica de Bethesda, mas alguns estudos apresentaram um percentual maior de casos de NIC II negativos para p16 (66,7%)⁵².

Tendo em vista que a marcação de p16 e Ki-67 tem relação com o grau da lesão, ou seja, quanto maior a área do epitélio marcada, maior a gravidade da lesão^{54,70,71}, é interessante notar que os casos avaliados para a marcação imuno-histoquímica de p16 pelo consenso dos patologistas como NIC II – HSIL apresentaram proporção de marcação total semelhante à encontrada nos casos de NIC III (80,7% e 90,1%, respectivamente). Enquanto que a marcação de p16 nos casos classificados como NIC II – LSIL mostrou-se inferior à marcação total apresentada pelo diagnóstico de NIC I, sugerindo que os casos que compõem o grupo diagnóstico de NIC II – LSIL devem ser, em grande parte, casos mimetizadores de HSIL, ou lesões relacionadas a HPV de baixo risco e, portanto, potencialmente regressoras.

Dessa forma, é possível supor que existam dois perfis de lesão de acordo com a marcação de p16, que tornam-se evidentes ao separar os casos como LSIL e HSIL de acordo com a LAST (13,9% e 81,5% de marcação total, respectivamente). Assim, esse marcador mostra-se útil para esclarecer interpretações diagnósticas duvidosas entre HSIL e seus mimetizadores, tendo em vista relatos prévios da relação de expressão de p16 com a infecção viral por HPV de alto risco⁷². A proporção de núcleos positivos para Ki-67 foi inferior na categoria diagnóstica de NIC II – LSIL em relação ao diagnóstico de NIC I, corroborando nossos achados de p16.

Diferentemente do p16 onde a distribuição dos percentuais de marcação entre categorias diagnósticas é bem distinta, o percentual de marcação do Ki-67 apresenta muita sobreposição entre as categorias diagnósticas (Tabela 6),

condição que dificulta a avaliação diagnóstica feita pelo patologista. Por esse motivo, é importante a definição de um ponto de corte que auxilie na construção do diagnóstico. O ponto de corte utilizado parece alto (50%), tendo em vista que a média de percentual de expressão do Ki-67 ficou em torno de 30% nas lesões de alto grau.

Considerando que a avaliação da expressão imuno-histoquímica também é dependente de observador e, por isso, sujeita a subjetividade da interpretação, a quantificação digital dos espécimes histológicos foi realizada para garantir maior reprodutibilidade dos resultados das análises, pois a técnica possui parâmetros fixos e objetivos de avaliação. No entanto, essa mesma característica que a torna mais reprodutível também a torna limitada pela impossibilidade de se adequar às limitações inerentes à amostra histológica e à técnica de imuno-histoquímica, tais como: fundo, contraste, dobras e inclusões anguladas.

Nosso estudo utilizou os dois métodos para avaliação das marcações imuno-histoquímicas, o consenso de pelo menos dois patologistas e a quantificação digital, que mostraram-se equivalentes. Os resultados de ambos os métodos de avaliação foram revistos e os casos divergentes confrontados, deixando claro que a associação dos dois métodos de análise seria capaz de prevenir uma avaliação equivocada devido às limitações inerentes a cada método. Maniar *et al.* (2015)⁴⁷ já havia relatado algumas dificuldades da avaliação das biópsias de grau intermediário, causando discrepâncias nas interpretações dos patologistas em relação aos critérios de positividade determinados pela LAST para p16, mas como houve treinamento dos patologistas e discussão sobre os critérios de positividade determinados pela

LAST anterior à avaliação dos patologistas, não foram encontradas muitas discrepâncias (5 casos - Tabela 7), atingindo um Kappa excelente para a classificação LAST.

As discrepâncias entre os dois métodos de avaliação de Ki-67 foram mais proeminentes (21 casos - Tabela 8), e quase inviabilizaram a percepção da relação do Ki-67 com o padrão ouro.

Essa diferença de discrepância, discreta em p16 e mais acentuada em Ki-67, se deve: ao padrão de marcação dos anticorpos (o primeiro é nuclear e citoplasmático e o segundo apenas nuclear); aos diferentes algoritmos de análise (área marcada *versus* núcleos marcados); e a forma de avaliar dos patologistas (o p16 semiquantitativo em terços e por intensidade, o Ki67 quantitativo), sendo a análise do p16 menos complexa que a do Ki-67. Enquanto o patologista não é tão preciso em quantificar, o *software* não consegue se adaptar a variabilidade do tamanho do núcleo e do contraste de cores da reação.

Algumas discordâncias entre o consenso do grupo revisor e a quantificação digital poderiam ter sido evitadas com o recorte de novas lâminas, repetição das reações de imuno-histoquímicas e treinamento dos patologistas na utilização do ponto de corte determinado no estudo para o Ki-67. Como essas medidas não foram tomadas previamente à coleta de dados, os possíveis vieses de aferição inerentes a cada forma de quantificar foram diminuídos na análise do status consolidado.

O desenho do estudo é transversal, composto por uma amostra de ocasião proveniente de um centro de referência e que foi caracterizado pela coleta de dados retrospectivos em banco de dados, configurando, assim, uma

limitação do estudo. Dessa forma, apesar de excluirmos todas as biópsias sabidamente excisionais do estudo e limitarmos o tempo em até um ano após a biópsia para definição do padrão ouro, não podemos excluir completamente a possibilidade de biópsia excisional, nem as possibilidades de regressão e progressão da doença.

É importante ressaltar que a histologia é uma representação estática de um processo dinâmico. Tendo em vista que a história natural da doença foi alterada pelo tratamento na maior parte dos casos, não podemos assegurar que as pacientes que permaneceram com o diagnóstico de NIC II nas peças de tratamento cirúrgico após a biópsia progrediriam para NIC III ou câncer ou se haveria regressão espontânea, caso fossem acompanhadas por mais tempo.

O presente estudo encontrou 23,1% dos casos com o diagnóstico de padrão ouro de “não NIC”, 24% de NIC I, 32,7% de NIC II e 16,4% de NIC III como padrão ouro. O fato dos diagnósticos de padrão ouro não terem sido revistos não explicaria a magnitude da diversidade dos diagnósticos de padrão ouro, tendo em vista que estes também foram diagnosticados por um grupo experiente de patologistas. A subjetividade da interpretação diagnóstica da peça cirúrgica é compensada pela maior representatividade da lesão, conferindo menor dificuldade ao diagnóstico em relação à biópsia,

Talvez esse achado reflita a heterogeneidade do comportamento biológico de NIC II, onde nem todas as lesões morfológicamente de alto grau e com expressão positiva para p16 (80,4%) possuem todas as alterações moleculares necessárias para sua caracterização como lesão pré-neoplásica. A variedade na distribuição do diagnóstico de padrão ouro nos faz refletir sobre a necessidade de ter um marcador mais confiável do que a faixa etária para evitar

sobretratamentos e, na ausência deste, manter uma categoria diagnóstica que reflita a incerteza do comportamento biológico.

Tendo em vista que o câncer do colo do útero é uma doença de evolução lenta⁷, era esperado que a maior parte dos casos obtivesse diagnóstico de NIC II no padrão ouro, pois este foi determinado pelos achados de peça cirúrgica ou exames de seguimento clínico até um ano após a biópsia. Apesar do diagnóstico de NIC II predominar em relação aos demais, apenas 32,7% dos casos foram confirmados como NIC II no padrão ouro e em 52,9% dos casos foi observado lesão de alto grau (NIC II, NIC III ou HSIL).

Miralpeix *et al.* (2016)¹³ também apresentou predomínio do diagnóstico de NIC II no cone posterior à biópsia, com cerca de 28,5% de NIC III, e apenas 1,6% de “não NIC”. As diferenças aqui relatadas poderiam estar relacionadas ao padrão ouro constituído exclusivamente por peça cirúrgica. Enquanto que o nosso estudo utilizou padrão ouro composto com casos que fizeram acompanhamento clínico até um ano. Além disso, há no grupo acompanhado clinicamente predomínio de pacientes jovens (mediana de 25,3 anos) e com maior tempo entre a biópsia e o padrão ouro (mediana de 291 dias), variáveis que apresentaram relação com padrão ouro de menor gravidade.

Em nosso estudo, o diagnóstico de padrão ouro menos frequente foi NIC III (16,4%). É interessante notar que dos dezessete casos com NIC III no padrão ouro, apenas três tiveram esse diagnóstico identificado na biópsia após a revisão pelos patologistas (Tabela 9). Do total de casos com padrão ouro de NIC III, 76,5% tiveram diagnóstico de NIC II na biópsia após consenso dos patologistas. Considerando o pouco tempo entre a biópsia e o exame de padrão ouro, o mais provável é que esse resultado seja decorrente de sub-representação da lesão

mais grave na biópsia. Esse achado está coberto pelas as Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero, que prevê o tratamento excisional em mulheres com diagnóstico de NIC II e com idade superior ou igual a 25 anos pela possibilidade de lesão mais grave do que a verificada na biópsia e por sua possibilidade de progressão.

Assim como o nosso, outros estudos também não observaram casos com padrão ouro de carcinoma cervical^{13,47}, sugerindo a baixa probabilidade de pacientes com diagnóstico de NIC II em biópsia cervical terem câncer.

Para facilitar a análise do desempenho diagnóstico optamos por confrontar o *status* do marcador imuno-histoquímico com o padrão ouro composto. Levando em consideração todas as limitações do nosso estudo, acima citadas, o desempenho diagnóstico para a avaliação de p16 mostrou alta sensibilidade e baixa especificidade, enquanto Ki-67 demonstrou alta especificidade e alto VPP, mas baixa sensibilidade quando utilizado o ponto de corte em \geq NIC II para o padrão ouro. No ponto de corte em \geq NIC III para o padrão ouro, a sensibilidade aumentou para p16, assim como o VPN, enquanto que a especificidade de Ki-67 se manteve alta e melhorou seu VPN, apesar da diminuição do valor preditivo positivo.

Interessante notar que o desempenho diagnóstico do consenso de H&E em relação ao corte em \geq NIC II apresentou desempenho ligeiramente melhor que p16 com perfil semelhante: alta sensibilidade. Enquanto que no corte em \geq NIC III, o perfil de desempenho do H&E mostrou-se semelhante ao Ki-67: alta especificidade. Outro dado relevante é que com o corte em \geq NIC III todos tiveram alto VPN.

Bergeron *et al.* (2010)⁵⁵ relataram desempenho semelhante para p16 (sensibilidade: 87%; especificidade: 12%), mas outros estudos demonstraram alta sensibilidade e especificidade para ambos os biomarcadores^{54,71,73,74,75,76}. No entanto, nenhum dos estudos citados avaliaram o desempenho diagnóstico em relação ao diagnóstico de padrão ouro, mas em relação ao padrão de marcação na própria biópsia. Também há relatos que ao associar a marcação dos dois biomarcadores, p16 e Ki-67, não foi verificada melhora no desempenho diagnóstico^{54,73}.

Nosso estudo não apresentou associação da marcação imuno-histoquímica de p16 com nenhuma categorização de padrão ouro testada. Esse dado é consistente com os achados de Guedes *et al.* (2007)⁷⁷ e Miralpeix *et al.* (2016)¹³, mas divergem dos dados apresentados por Miyamoto *et al.* (2016)¹⁴, que apesar do desenho metodológico semelhante, encontraram associação de p16 com o padrão ouro testado, assim como Maniar *et al.* (2015)⁴⁷, mas neste último estudo havia outras amostras da região anogenital e não apenas colo uterino. O presente estudo identificou a associação da marcação positiva de Ki-67 (em mais de 50% das células) com o padrão ouro em todas as classificações de padrão ouro testadas. Outros estudos que utilizaram o mesmo critério de positividade para Ki-67 também verificaram que houve associação significativa entre os grupos de padrão ouro verificados^{13,14}.

A distribuição da expressão de Ki-67 por terços não apresentou associação com o diagnóstico de padrão ouro. Outros estudos corroboram nossos achados^{13,71}.

Também pudemos verificar no estudo que a mediana de idade para pacientes com padrão ouro “não NIC” era inferior à mediana para pacientes com

algum grau de alteração nos exames de seguimento. Esses dados estão de acordo com a literatura de que pacientes mais jovens tendem à regressão de lesões de NIC II^{41,42,43}.

Nossa amostra (idade média de 33,6 anos) mostrou uma tendência em realizar tratamento cirúrgico em pacientes com diagnóstico de NIC II (70,2%), o que corresponde às recomendações vigentes, que preveem o manejo conservador apenas em pacientes jovens com diagnóstico de NIC II (idade igual ou inferior a 24 anos). Maniar *et al.* (2015)⁴⁷ também encontrou proporção elevada de casos com lesão de grau intermediário que fizeram tratamento excisional (78,9%), porém, incluiu biópsias com lesões relacionadas ao HPV de outros sítios.

O baixo percentual de NIC III encontrado nas peças de tratamento excisional, observadas não somente neste estudo, mas também nos estudos de Maniar *et al.* (2015)⁴⁷ e Miralpeix *et al.* (2016)¹³, associado aos relatos de altas taxas de regressão (40%⁷⁸; 83,7%⁷⁹) dos casos de NIC II seguidos clinicamente, demonstram a ineficiência dos métodos diagnósticos atualmente disponíveis em identificar com precisão as lesões pré-neoplásicas das lesões potencialmente regressoras, gerando sobretratamento na maioria desses casos.

Nossos resultados apontam associação entre a conduta clínica adotada e o diagnóstico de padrão ouro obtido, onde a conduta clínica frente ao diagnóstico de NIC II, derivada da aplicação das diretrizes vigentes, foi capaz de reconhecer e tratar todas as pacientes com lesão pré-neoplásica (NIC III) no decorrer de um ano após o diagnóstico de NIC II e ainda identificar 55,1% das pacientes com potencial de regressão, sem a utilização de biomarcadores. Esse fato se explica, em parte, pelo caráter transversal e com coleta de dados

retrospectiva com exclusão de casos sem dados de acompanhamento clínico após a biópsia.

O presente estudo mostrou tendência na classificação de amostras de NIC II como positivas na avaliação de p16. Caso as recomendações da LAST fossem aplicadas na amostra deste estudo, causaríamos mais sobretratamentos nas pacientes que foram acompanhadas. Esses achados também foram observados por Thrall *et al.* (2016)⁸⁰ que além de observarem o aumento do número de casos diagnosticados como HSIL após a implementação da LAST na rotina diagnóstica, ainda verificaram que esse aumento foi mais expressivo na faixa etária de mulheres jovens (15 a 24 anos), que possui altas taxas de regressão (cerca de 70% em três anos)^{41,42,43}, causando o sobretratamento dessas pacientes.

No grupo tratado, a utilização da LAST poderia ter evitado 27,3% dos casos de sobretratamento, em contrapartida, levaria ao subtratamento de casos de NIC III, o que não é desejável.

Clark *et al.* (2016)⁸¹ referiram em seu estudo que os erros mais significativos encontrados na implementação das recomendações LAST foram a utilização desnecessária em casos inequívocos de NIC I e reclassificação para o diagnóstico de HSIL em lesões com morfologia de alto grau questionável.

Apesar de não termos encontrado associação entre a marcação de p16 com o padrão ouro, estudo prospectivo mostrou relação entre a marcação imuno-histoquímica de p16 em amostras de NIC II com o desfecho de \geq NIC III nessas pacientes¹⁵ e, nesse ponto de corte, o VPN encontrado foi alto em nosso estudo, bem como a sensibilidade.

Verificamos tendência em avaliar as marcações de Ki-67 como negativas, o que não foi confirmado por outros estudos¹³. Poucos estudos avaliam a utilidade de Ki-67 na predição do desfecho das pacientes com diagnóstico de NIC II^{13,14}.

Nossos achados mostram alguma aplicabilidade desses marcadores na prática clínica, mas ainda não há dados suficientes que sustentem sua aplicação na avaliação diagnóstica de rotina em todas as biópsias de NIC II como preconiza a LAST.

Considerando o aumento da reprodutibilidade diagnóstica com o uso do p16 e de sua alta sensibilidade em identificar lesão de \geq NIC III, assim como seu alto valor preditivo negativo, a aplicação deste biomarcador seria mais útil nos casos de dúvida entre HSIL e seus mimetizadores. O mesmo ocorre com o Ki-67, pela alta especificidade e valor preditivo negativo em identificar lesões de \geq NIC III e seu alto valor preditivo positivo para lesões de \geq NIC II.

Estudos prospectivos com maior poder estatístico, sem interferência na história natural da doença, são necessários para avaliar a validade clínica desses biomarcadores na rotina diagnóstica e o valor prognóstico da expressão positiva de p16 e Ki-67 nas pacientes com diagnóstico de NIC II na biópsia do colo do útero.

Capítulo 10 – Conclusões

A expressão imuno-histoquímica de p16 e Ki-67 melhora a concordância interobservador, sendo a LAST mais reprodutível do que a classificação histológica convencional.

As duas formas de avaliação das marcações imuno-histoquímicas, quantificação digital de imagem e consenso do grupo revisor, são equivalentes. No entanto, a associação dos dois métodos melhora o desempenho diagnóstico de Ki-67.

O *status* de p16 não tem associação com o diagnóstico das peças cirúrgicas ou exames de acompanhamento clínico até um ano após a biópsia de NIC II, enquanto que o *status* de Ki-67 mostrou essa associação.

A avaliação de p16 é sensível e tem alto valor preditivo negativo, enquanto que a avaliação de Ki-67 demonstrou alta especificidade e alto valor preditivo negativo para diagnóstico de \geq NIC III.

A utilização de p16 para classificar os casos de NIC II em LSIL e HSIL, causaria mais frequentemente o sobretratamento das pacientes de NIC II, enquanto que Ki-67 causaria maior frequência de casos subtratados.

A aplicabilidade do Ki-67 para definição de conduta clínica em um programa de rastreio é limitada devido a sua baixa sensibilidade.

Referências bibliográficas

1. Brasil/MS/INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017.
2. Brasil/MS/INCA. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer/ Ministério da Saúde, 2016.
3. Darragh TM; Colgan TJ; Cox JT *et al.* The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for colposcopy and cervical pathology. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, Volume 16, Number 3, 205-242, 2012.
4. Brasil/MS/INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.
5. Brito-Silva, K., Bezerra, A. F. B., Chaves, L. D. P. & Tanaka, O. Y. Integralidade no cuidado ao câncer do colo do útero: avaliação do acesso. *Rev. Saúde Pública* 48, 240–248, 2014.
6. Vale, D. B. A. P. do, Moraes, S. S., Pimenta, A. L. & Zeferino, L. C. Assessment of the cervical cancer screening in the Family Health Strategy in Amparo, Sao Paulo State, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 26, 383–390, 2010.
7. MS/INCA. Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional, volume IV. Rio de Janeiro: INCA, 2010.
8. Discacciati MG; Souza CAS; D’otavianno MG *et al.* Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 155, 204 – 208, 2011.

9. Ismail SM; Colclough AB; Dinnen JS *et al.* Observer variation in histopathological diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasia. *BMJ*. 298:707–10, 1989.
10. Collaço LM; Wendling LU; Noronha L *et al.* Análise do controle de qualidade das biópsias e produtos de cirurgia de alta frequência no Programa de Prevenção do Câncer do Colo do Útero do estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 58: 489-496, 2012.
11. Castle PE; Stoler MH; Solomon D *et al.* The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology reviewed diagnoses: na ALTS report. *Am J Clin Pathol*. 127:805-815, 2007.
12. Bruinsma FJ; QUINN MA. The risk of preterm birth following treatment for precancerous changes in the cervix: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*, 118:1031-1041, 2011.
13. Miralpeix E; Solé-sodeño JM; Mancebo G *et al.* Value of p16^{INK4a} and Ki-67 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia grade 2 biopsies as biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 in cone results. *Anal Quant Cytopathol Histpathol*. 38(1):1-8, 2016.
14. Miyamoto S; Hasegawa J; Morioka M *et al.* The association between p16 and ki-67 immunohistostaining and the progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 134: 45-48, 2016.
15. Omori M; Hashi A; Nakazawa K *et al.* Estimation of Prognoses for Cervical Intraepithelial Neoplasia 2 by p^{16INK4a} Immunoexpression and High-Risk HPV In Situ Hybridization Signal Types. *Am J Clin Pathol* 128:208-217, 2007.
16. Brown CA; Bogers J; Sahebali S *et al.* Role of Protein Biomarkers in the Detection of High-Grade Disease in Cervical Cancer Screening Programs. *Journal of Oncology*, 2012.

17. Ordi J; Garcia S; Del Pino M *et al.* p16INK4a Immunostaining Identifies Occult CIN Lesions in HPV-positive Women. *International Journal of Gynecological Pathology* 28:90–97, 2008.
18. Kruse AJ; Baak JPA; Janssen EA. Low- and high-risk CIN 1 and 2 lesions: prospective predictive value of grade, HPV, and Ki-67 immuno-quantitative variables. *J Pathol* 199: 462–470, 2003.
19. IARC. A review of human carcinogens. Lyon: Biological agents, volume 100B (International Agency for Research on Cancer), 2012.
20. Ferlay J; Soerjomataram I; Dikshit R *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*: 136, E359–E386, 2015.
21. Torre LA; Bray F; Siegel RL *et al.* Global Cancer Statistics, 2012. *CA CANCER J CLIN* 65:87–108, 2015.
22. Ministério da Saúde. Informe técnico sobre a vacina contra o papilomavírus humano (HPV) na atenção básica. MS, 2013.
23. Walboomers JMM; Jacobs MV; Manos MM *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. 189:12-19, 1999.
24. Bosch FX; Lorincz A; Muñoz N *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J ClinPathol* 55:244-65, 2002.
25. Schiffman MH; Bauer HM; Hoover RN *et al.* Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 85:958-64, 1993.
26. Trottier H; Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 24:S1-15, 2006.

27. Muñoz N; Castellsagué X; De González AB *et al.* Chapter 1: HPV in etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006.
28. Steben M; Duarte-franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology*. 107:S2-S5, 2007.
29. Muñoz N; Bosch FX; De Sanjosé S *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 348:518–27, 2003.
30. Koutsky L. Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection. *Am J Med* 102(5A):3–8, 1997.
31. Fonseca FV; Tomasich FDS; Jung JE. Neoplasia intraepitelial cervical: da etiopatogenia ao desempenho da tecnologia no rastreio e no seguimento. *DST - J bras Doenças Sex Transm*. 24:53-61, 2012.
32. Reagan JW; Hicks DJ. A study of in situ and squamous-cell cancer of the uterine cervix. *Cancer* 6(6):1200-14, 1953.
33. Aidé S; Almeida G; Do Val I *et al.* Neoplasia Intraepitelial Cervical. *DST - J bras Doenças Sex Transm* 21: 166-170, 2009.
34. RICHART, 1968 apud Aidé S; Almeida G; Do Val I *et al.* Neoplasia Intraepitelial Cervical. *DST - J bras Doenças Sex Transm* 21: 166-170, 2009.
35. Sellors JW; Sankaranarayanan R. Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: manual para principiantes. Lyon: Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, 2004.
36. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: Human Papillomaviruses, vol 90 (International Agency for Research on Cancer), 2007.

37. IARC. IARC handbooks of cancer prevention. Lyon: Cervix cancer screening, volume 10 (International Agency for Research on Cancer), 2005.
38. IARC. NIC 2. International Agency For Research on Cancer. Disponível em: <http://screening.iarc.fr/atlashisto_detail.php?flag=0&lang=4&id=00002387&cat=E1b>. Acesso em: 2 abr. 2015, às 15.
39. Ferreira AL. Avaliação da reprodutibilidade diagnóstica das biópsias de colo uterino do serviço de anatomia patológica do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira [trabalho de conclusão de curso]. Rio de Janeiro: Centro Universitário Hermínio da Silveira – IBMR – Laureate International Universities, Curso de Biomedicina; 2015.
40. Motamedi M; Böhmer G; Neumann HH; Wasielewski R. CIN III lesions and regression: retrospective analysis of 635 cases. *BMC Infectious Diseases* 15:541, 2015.
41. Moscicki AB; Ma Y; Wibbelsman C *et al.* Rate of and risks for regression of CIN-2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol*; 116(6): 1373–1380, 2010.
42. Fuchs K; Weitzen S; Wu L; Phipps MG; Boardman LA. Management of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescent and young women. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 20(5): 269–274, 2007.
43. Monteiro DLM; Trajano AJB; Russomano FB; Silva KS. Prognosis IF intraepithelial cervical lesion during adolescence in up to two years of follow-up. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 23:230-236, 2010.
44. Matsumoto K; Oki A; Furuta R; Maeda H *et al.* Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study. *Int. J. Cancer*: 128, 2898–2910, 2011.

45. Saslow D; Runowicz CD; Solomon D *et al.* American Cancer Society Guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin.* 52:342-362, 2002.
46. WHO. WHO guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention. WHO, 2013.
47. Maniar KP, Sanchez B, Paintal A *et al.* Role of the biomarker p16 in downgrading CIN 2 diagnoses and predicting higher-grade lesions. *The American journal of surgical pathology.* LWW; 39(12):1708–1718, 2015.
48. Agarwal P; Kabir FL; DeInnocentes P; Bird RC. Tumor suppressor gene p16/INK4A/CDKN2A and its role in cell cycle exit, differentiation, and determination of cell fate. *Tumor Suppressor Genes*, 2012.
49. Romagosa C; Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, Ramon y Cajal S. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*, 30, 2087–2097, 2011.
50. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*, 130(8): 1715–1725, 2012.
51. Tsoumpou I; Arbyn M; Kyrgiou M. p16 (INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*, 35 (3): 210-20, 2009.
52. Silva VR. O impacto da marcação imuno-histoquímica para p16 e ki-67 na reprodutibilidade diagnóstica das biópsias do colo uterino. Rio de Janeiro. Tese [Mestrado]. Fundação Oswaldo Cruz- Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente. 2016.
53. Reuschenbach M; Wentzensen N; Dijkstra MG *et al.* p16INK4a Immunohistochemistry in Cervical Biopsy Specimens. *American journal of clinical pathology.* The Oxford University Press; 142(6):767–772, 2014.

54. Kanthiya K; Khunnarong J; Tangjitgamol S *et al.* Expression of the p16 and Ki67 in cervical squamous intraepithelial lesions and cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17 (7), 3201 – 3206, 2016.
55. Bergeron C; Ordi J; Schmidt D *et al.* Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *American Journal of Clinical Pathology*. The Oxford University Press;133(3):395–406, 2010.
56. Galgano MT; Castle PE; Atkins KA *et al.* Using biomarkers as objective Standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol*, 34(8): 1077–1087, 2010.
57. De Sam Lazaro S; Newbill CP; Berlin M *et al.* P16 staining of cervical biopsies may decrease the frequency of unnecessary loop electrosurgical excision procedures. *J Low Genit Tract Dis*, 20: 201-206, 2016.
58. Evanthia A; Kostopoulou; George Koukoulis. Immunohistochemistry in the diagnosis of squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Human Papillomavirus and Related Diseases. A Clinical Perspective*, Dr. Davy Vanden Broeck (Ed.): InTech, 41-64, 2012.
59. Pires ARC, Andreiuolo FM, Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagnostic Pathology*. BioMed Central; 1(1):1, 2006.
60. Cai B; Ronnett BM; Stoler M *et al.* Longitudinal evaluation of interobserver and intraobserver agreement of cervical intraepithelial neoplasia diagnosis among an experienced panel of gynecologic pathologists. *Am J Surg Pathol* 31:1854–1860, 2007.
61. Palma PD; Rossi PG; Collina G *et al.* The reproducibility of CIN diagnoses among different pathologists: data from histology reviews from a multicenter randomized study. *Am J Clin Pathol* 132:125-132, 2009.

62. Stoler MH, Ronnett BM, Joste NE, Hunt WC, Cuzick J, Wheeler CM. The interpretive variability of cervical biopsies and its relationship to HPV status. *Am J Surg Pathol*.39(6):729, 2015.
63. Carreon JD, Sherman ME, Guillén D *et al*. CIN2 is a much less reproducible and less valid diagnosis than CIN3: results from a histological review population-based cervical samples. *Int J Gynecol Pathol*,26:441-6, 2007.
64. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, *et al*. p16^{INK4a} immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *The American journal of surgical pathology*. LWW 26(11): 1389–1399, 2002.
65. Horn L; Reichert A; Oster A *et al*. Immunostaining for p16^{INK4a} used as a conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 32:502–512, 2008.
66. Gurrola-Díaz CM, Suárez-Rincón AE, Vázquez-Camacho G *et al*. P16^{INK4a} immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. *Gynecol Oncol* 111(1):120-4, 2008.
67. Dijkstra MG; Heideman DAM; Roy SC *et al*. p16^{INK4a} immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions. *J Clin Pathol* 63:972-977, 2010.
68. Pacchiarotti A; Galeotti S; Bellardini P *et al*. Impact of p16^{ink4a} immunohistochemistry staining on interobserver agreement on the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 141:367-373, 2014.
69. Malpica A, Deaver TD, Euscher E *Biopsy interpretation Series, Biopsy interpretation of the uterine cervix and corpus*, 1 ED. Editors Wolker Klumer/lippincott Williams &Wilkins, 2009 Philadelphia

70. Kruse A; Baak JPA; Bruin PC. Jiwa *et al.* The HS. Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol* 193: 48-54, 2001.
71. Mimica M; Tomic S; Kardum G; Hofman ID; Kaliterna V; PejkoVIC L. Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human Papillomavirus infection. *Int J Gynecol Cancer* 20: 116-119, 2010.
72. Nam EJ; Kim JW; Hong JW *et al.* Expression of the p16^{INK4a} and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol*, 19(3): 162–168, 2008.
73. Cavalcante DM; Linhares IM; Pompeu MML; Giraldo PC; Eleutério J. The utility of p16^{INK4a} and Ki-67 to identify high-grade squamous intraepithelial lesion in adolescents and young women. *Indian Journal Of Pathology And Microbiology* - 55(3), 2012.
74. Niekerk DV; Guillaud M; Maticic J; Benedet JL; Freeberg JÁ; Follen M; MacAulay C. p16 and MIB1 improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of high grade squamous intraepithelial lesions: methodological issues in a report of 447 biopsies with consensus diagnosis and HPV HCII testing. *Gynecologic Oncology* 107 S233–S240, 2007.
75. Hebbar A; Murthy VS. Role of p16/INK4a and Ki-67 as specific biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia: an institutional study. *Journal of Laboratory Physicians* Volume 9, Issue 2, 2017.
76. Xing Y; Wang C; Wu J. Expression of geminin, p16, and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues. *Medicine* 96:26, 2017.
77. Guedes AC, Brenna SMF, Coelho SAS, Martinez EZ, Syrjanen KJ, Zeferino LC. p16INK4a expression does not predict the outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Int J Gynecol Cancer* 17:1099–1103, 2007.

- 78.Castle PE; Schiffman M; Wheeler CM; Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet Gynecol.* 2009 January ; 113(1): 18–25
- 79.Dibe ND. O impacto da aplicação das recomendações do projeto Lower Anogenital Stromal Terminology (LAST) nas biópsias de colo uterino com diagnóstico de neoplasia intraepitelial grau II. [trabalho de conclusão de curso]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Curso de Medicina; 2017.
- 80.Thrall MJ. Effect of Lower Anogenital Squamous Terminology Recommendations on the use of p16 immunohistochemistry and the proportion of high-grade diagnoses in cervical biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* April 145:524-530, 2016.
- 81.Clark JL; Lu D; Kalir T; Liu Y. Overdiagnosis of HSIL on cervical biopsy: errors in p16 immunohistochemistry implementation. *Hum Pathol.* 55:51-6, 2016.

APÊNDICE A – Ficha de coleta

Patologista: () P1 () P2 () P3

Caso	Diagnóstico H&E	p16			Ki-67			Observações
		IHQ terço: (1) (2) (3) Distribuição: (F) (MF) (D) Intensidade: (N) (F) (M) (A)	Status (LAST): (+) (-)	Diagnóstico(LAST)	IHQ terço: (1) (2) (3) Distribuição: (F) (MF) (D) Intensidade: (N) (F) (M) (A)	Descrição dos terços: 1º (inf.) _____% 2º (int.) _____% 3º (sup.) _____%	Diagnóstico:	
() Não NIC () NIC I () NIC II () NIC III () Carcinoma				() NIC I () NIC II – LSIL () NIC II – HSIL () NIC III () Outros:			() NIC I () NIC II – LSIL () NIC II – HSIL () NIC III () Outros:	
() Não NIC () NIC I () NIC II () NIC III () Carcinoma				() NIC I () NIC II – LSIL () NIC II – HSIL () NIC III () Outros:			() NIC I () NIC II – LSIL () NIC II – HSIL () NIC III () Outros:	
() Não NIC () NIC I () NIC II () NIC III () Carcinoma				() NIC I () NIC II – LSIL () NIC II – HSIL () NIC III () Outros:			() NIC I () NIC II – LSIL () NIC II – HSIL () NIC III () Outros:	
() Não NIC () NIC I () NIC II () NIC III () Carcinoma				() NIC I () NIC II – LSIL () NIC II – HSIL () NIC III () Outros:			() NIC I () NIC II – LSIL () NIC II – HSIL () NIC III () Outros:	

F (distribuição): Focal
MF: Multifocal
D: Difusa

N: Negativo
F (intensidade): fraca
M: Moderada
A: Acentuada

APÊNDICE B – Instruções para preenchimento da ficha de coleta

Pós-graduação em Pesquisa Aplicada a Saúde da Criança e da Mulher – IFF/Fiocruz

O significado da expressão de p16^{INK14a} e Ki-67 em biópsia cervical de NIC II

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DA FICHA DE COLETA

Você deverá avaliar a lâmina de H&E, registrando sua impressão quanto ao diagnóstico na ficha de coleta, e na sequência avaliar as lâminas de p16 e Ki-67. No total serão avaliadas 420 lâminas, provenientes de 140 casos, sendo 280 lâminas de imuno-histoquímica.

A coluna “**caso**” deverá ser preenchida com a numeração registrada nas lâminas.

Na coluna “**diagnóstico H&E**” deverá ser registrada sua impressão quanto ao diagnóstico antes de observar as lâminas referentes as marcações imuno-histoquímicas, p16 e Ki-67. Uma das seguintes alternativas deverá ser assinalada na ficha de coleta: não NIC, NIC I, NIC II, NIC III e carcinoma.

A avaliação do marcador **p16** será realizada em três etapas. Você deverá avaliar os critérios da marcação para IHQ terço, distribuição e intensidade.

1. Para IHQ terço, você deverá assinalar 1, 2 ou 3, de acordo com o terço onde podem ser observadas células marcadas para p16. 1=células basais; 2=células intermediárias; 3=células superficiais.
2. Para distribuição, você deverá assinalar F se a distribuição da marcação for focal, MF se a marcação for multifocal e D para a marcação difusa.
3. Para intensidade, você deverá assinalar N (negativo) se não houver marcação para p16, F para a marcação fraca, M para a marcação moderada e A para a marcação acentuada.

A segunda etapa da avaliação de p16 consistirá na determinação se a marcação é positiva ou negativa de acordo com os critérios da LAST. Segundo a LAST, *a marcação positiva para p16 consiste em uma marcação forte, difusa e em pelo menos um terço do epitélio*. Marcações focais ou multifocais são consideradas negativas pela recomendação (LAST).

A terceira etapa consiste em dar o diagnóstico do caso pela marcação de p16, conforme recomendado pela LAST. Nesse caso, casos de NIC II positivos para p16, segundo os critérios já citados estabelecidos pela LAST, são classificados como NIC II - HSIL. Já para os casos considerados p16-negativos segundo os critérios da LAST serão classificados como NIC II – LSIL.

Você ainda terá a opção de escolher entre NIC I, NIC III e outros. Caso a alternativa escolhida seja “outros” você deverá especificar o diagnóstico.

A avaliação de **Ki-67** também será realizada em três etapas, devendo avaliar os critérios de IHQ terço, distribuição e intensidade.

1. Para IHQ terço, você deverá assinalar 1, 2 ou 3, de acordo com o terço onde podem ser observadas células marcadas para Ki-67. 1=células basais; 2=células intermediárias; 3=células superficiais.
2. Para distribuição, você deverá assinalar F se a distribuição da marcação for focal, MF se a marcação for multifocal e D para a marcação difusa.
3. Para intensidade, você deverá assinalar N (negativo) se não houver marcação para Ki-67, F para a marcação fraca, M para a marcação moderada e A para a marcação acentuada.

A segunda etapa da avaliação de Ki-67 deverá ser feita pela descrição dos terços do epitélio. Você deverá especificar a porcentagem aproximada de células marcadas para Ki-67 em cada terço. Sugerimos a utilização das seguintes faixas de porcentagem na avaliação dos terços do epitélio: 0, 1 – 10%, 11 – 25%, 26 – 50%, 51 – 75% ou > 75%. 1º terço = células basais; 2º terço = células intermediárias; 3º terço = células superficiais.

Na terceira etapa da avaliação de Ki-67 você deverá escolher uma das categorias diagnósticas para o caso através da marcação de Ki-67. As opções disponíveis são NIC I, NIC II – LSIL, NIC II – HSIL, NIC III e outros. Caso a alternativa escolhida seja “outros” você deverá especificar o diagnóstico.

Na coluna “**observações**” você deverá sugerir a exclusão de algum caso, em que houver diferença na representatividade da lesão entre as lâminas de H&E e de imuno-histoquímica (p16 e Ki-67), ou alguma possível incongruência entre a expressão dos dois marcadores entre si ou com o HE, ou ainda referir qualquer outra situação que julgue importante em relação a dificuldade diagnóstica.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP
INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O valor da marcação imuno-histoquímica de p16, Ki67, p21 e ciclina D1 para o diagnóstico das lesões intra-epiteliais escamosas do colo uterino. **Pesquisador:** Cecilia Vianna de Andrade

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11542213.2.0000.5269

Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

Patrocinador Principal: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS
 FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 258.124

Data da Relatoria: 28/03/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto para avaliar a melhoria da qualidade do diagnóstico das biopsias de colo uterino, através de marcadores biológicos e de tecnologias de digitalização de imagem, tentando identificar os elementos que atrapalham esse processo, visando o uso racional desses recursos e capacitação/reciclagem dos profissionais envolvidos no diagnóstico.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar o valor diagnóstico da expressão dos marcadores Ki-67, p16, p21, ciclina D1 nas Lesões intraepiteliais escamosas cervicais (SIL) com auxílio de análise digital.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ausência de riscos físico ou biológico ao paciente, tendo em vista que estudo será realizado em material de arquivo de blocos de parafina do serviço, sem necessidade de coletar novas amostras para esse estudo. Risco de esgotar o material no bloco, que não chega a ter consequências para o paciente pois a lâmina original está no arquivo preservada e o laudo com o respectivo diagnóstico está a disposição do paciente no prontuário e no arquivo da patologia.

Benefícios para o paciente apenas de ter mais dados (resultados dos marcadores) sobre sua patologia, sem outros benefícios enquanto não for demonstrada a utilidade desses marcadores (para diagnóstico ou prognóstico). Para instituição/prática diagnóstica: Melhorar a precisão

diagnóstica através de métodos mais objetivos (imuno-histoquímica e análise digital) Estabelecer um

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



protocolo de utilização dos marcadores que se mostrarem efetivos no auxílio diagnóstico. Se equipar e capacitar o departamento de patologia do IFF para gerar conhecimento que agregue informações importantes para problemas relevantes para o Sistema Único de Saúde. Implementar a imuno-histoquímica no departamento de anatomia patológica e citopatologia. Adquirir experiência com ensino a distância na capacitação de recursos humanos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de interesse da Instituição com incorporação de novas tecnologias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados em conformidade todos os termos obrigatórios.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendência ou inadequação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 28 de Abril de 2013

**Assinador por: maria
elisabeth lopes moreira
(Coordenador)**

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br