

# **O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.**

Marta de Figueiredo Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(mestrado integrado)

Orientador: Dr. Vítor Manuel Branco e Silva Caeiro  
Coorientador: Prof. Doutor José Alberto Fonseca Moutinho

maio de 2019

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Dr. Vítor Manuel Branco e Silva Caeiro pela disponibilidade que mostrou na minha orientação, pelo seu apoio científico e contributo neste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor José Alberto Fonseca Moutinho pela disponibilidade para integrar este trabalho, pelo seu apoio científico e contributo neste trabalho.

À minha família pelo apoio incondicional.

Aos amigos que fiz e que sempre estiveram disponíveis para me ouvir.

À Covilhã e à FCS-UBI por tudo o que me proporcionaram.

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## Resumo

**Introdução:** O cancro do colo do útero (CCU) encontra-se, segundo dados de 2018, entre as 10 neoplasias mais comuns no mundo. O rastreio do CUU tem impacto na morbimortalidade feminina, contudo, continua a apresentar desafios, mantendo-se a procura por novas abordagens que maximizem a sua performance.

**Objetivos:** Nesta monografia pretende-se explorar a utilidade da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 (CINtec®PLUS) no rastreio do CCU, descrever a sua execução e limitações e explorar a sua utilidade como método de rastreio primário e como método reflexo na triagem de teste de HPV positivo, teste de HPV positivo e citologia conhecida, citologia e HPV desconhecido, assim como a sua aplicação no rastreio das lesões não pavimentosas e a relação com a infeção por *Chlamydia trachomatis*.

**Material e Métodos:** Pesquisa realizada entre junho de 2019 e fevereiro de 2020, nas bases de dados: Pubmed e a Willey Online Library. Recorreu-se, ainda, a material online do fabricante do CINtec®PLUS, a guidelines nacionais da Sociedade Portuguesa de Ginecologia (SPG) e internacionais da US Preventive Services Task Force, material da FIGO, livros da especialidade de ginecologia e microbiologia e da Classificação de Bethesda e uma tese de mestrado portuguesa.

**Resultados:** A expressão de p16/ki-67 relaciona-se com a severidade das lesões citológica e histológica. Como teste primário poderá compensar a baixa sensibilidade da citologia e a baixa especificidade do teste de HPV, contudo não existe informação suficiente para o considerar método de rastreio primário. Como método de triagem, em mulheres HPV positivas, apresenta uma sensibilidade acima dos 80%, mas uma especificidade inferior à citologia. A concordância com a histologia foi superior à da citologia, com performance superior ou semelhante a esta. Abordagens combinadas ou sequenciais com genotipagem de HPV16/18 atingiram melhor performance. No caso de mulheres HPV positivas com citologia conhecida, apresentou boa performance mesmo em NILM/HPV-positivas. A combinação com genotipagem permitiria diminuir os falsos negativos. Em mulheres com citologia anormal mostra-se útil em mulheres com <30 anos e em especial com LSIL.

**Conclusão:** O CINtec®PLUS é uma técnica de fácil execução e treino. Pode contribuir para a diminuição das referências para colposcopia e está indicado em contextos de rastreio primário de HPV e de rastreio com citologia cervical e teste de HPV-HR. Também em casos HPV positivos com citologia anormal e onde apenas é conhecida citologia normal pode ser promissor.

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## **Palavras-chave**

Papilomavírus Humano; Cancro do Colo do Útero; p16; p16INK4a; Ki-67.

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## Abstract

**Introduction:** Cervical Cancer (CC) appears, according to data from 2018, among the 10 most common neoplasms in the world. The implemented CC screening has impact in the female morbimortality, however, continues to present underlying challenge, maintaining keeping the search for new approaches that maximize its performance.

**Objectives:** This monograph aims to explore the utility of p16INK4a/Ki-67 dual stain (CINtec®PLUS) in CC screening, describe its implementation and limitations and explore its usefulness as a primary method and as a reflex method in screening for HPV positive testing, positive HPV test and known cytology, known cytology and unknown HPV and usefulness in non-squamous lesions and its relation with *Chlamydia trachomatis* infection.

**Material and methods:** Search conducted between July of 2019 and February of 2020 in: Pubmed and Willey Online Library. It was also used online material from CINtec®PLUS manufacture, national guidelines from SPG and international guidelines from the US Preventive Services Task Force, material from FIGO, specialty books of gynaecology, microbiology and the Bethesda Classification were used, as well as a portuguese master's thesis.

**Results:** The expression of p16/ki-67 relates with cytological and histological severity. As a primary screening teste could compensate the low sensitivity of cytology and low specificity of HPV testing, however there is not enough information to consider it as primary screening method. As a triage method, in HPV-positive women, presents a sensitivity above 80%, but inferior specificity than cytology. Agreement between histology is superior to cytology, with superior or similar performance. Combined or sequential approaches with HPV16/18 genotyping achieved better performance. In the case of HPV positive women with known cytology, it performed well even in NILM/HPV-positive women. The combination with genotyping would reduce false negatives. In women with abnormal cytology, it is useful in women <30 years, especially with LSIL.

**Conclusion:** CINtec®PLUS is a technique of easy execution and training. It can contribute to the lowering of referrals to colposcopy and is indicated in contexts of primary HPV screening and in screening with cytology and HPV-HR testing. Also, in HPV positive cases with abnormal cytology and in which only abnormal cytology is known could be promising.

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## **Keywords**

Human Papillomavirus; Cervical Cancer; p16; p16INK4a; Ki-67.

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

# Índice

Capítulo 1: Introdução e Contextualização.....	1
1.1. Papilomavírus Humano e a Carcinogénese.....	1
1.2. Cancro do Colo do útero. ....	2
1.3 Rastreio do CCU.....	2
1.3.1. Testes de Rastreio.....	3
1.3.2. Terminologia: Citologia.....	4
1.3.3. Terminologia: Histologia. ....	6
1.3.4. Considerações sobre os Resultados Citológicos.....	6
Capítulo 2: Objetivos. ....	9
Capítulo 3: Material e Métodos. ....	11
Capítulo 4: Desenvolvimento. ....	13
4.1 Descrição da técnica de CINtec®PLUS (p16INK4a/Ki-67 dual stain). ....	13
4.1.1. Automatização. ....	14
4.1.2 Reprodutibilidade. ....	15
4.1.3 Limitações. ....	16
4.2 P16/Ki-67 no Rastreio do CCU.....	17
4.2.1 P16/Ki-67 como método primário de rastreio. ....	18
4.2.2 P16/Ki-67 como método reflexo de teste de HPV positivo.....	20
4.2.3 P16/Ki-67 como método reflexo a HPV positivo e citologia conhecida. ....	23
4.2.4 P16/Ki-67 como método reflexo de Citologia anormal e HPV desconhecido.....	26
4.3 P16/Ki-67 e relação com a Genotipagem. ....	30
4.4. P16/Ki-67 na avaliação do risco oncológico. ....	32
4.5. Avaliação dos Custos. ....	34
4.6. Situações particulares.....	35
4.6.1. Alterações Glandulares. ....	35
4.6.2. Infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	35
Capítulo 5: Conclusão.....	37
Capítulo 6: Bibliografia. ....	41

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## **Lista de Figuras**

Figura 1: Classificação de Richart e Classificação LAST. Retirado de (5). .....	6
---	---

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Anomalias celulares epiteliais. Adaptado de (15).....	5
Tabela 2: Anomalias celulares glandulares. Adaptado de (15).....	5
Tabela 3: Indicações aprovadas por idade. Adaptado de (31).....	14
Tabela 4: Relação entre a marcação dupla p16/Ki-67 e a citologia e teste de HPV como rastreio primário. Adaptado de (21,26). (ne: não especificado). ....	19
Tabela 5: Relação entre a marcação dupla p16/Ki-67, citologia e genotipagem de HPV16/18 na triagem de HPV positivas. Adaptado de (26,37,42,46). (LBC: Citologia em meio líquido: es: estiticamente significativo).....	20
Tabela 6: Abordagem combinadas e sequenciais na triagem de HPV positivas, sensibilidade (S) e especificidade (E) para CIN2+ e número de colposcopias resultantes. Adaptado de Stanczuk et al. (46). (LBC: citologia em meio líquido, positiva se: ASC-US+). ....	22
Tabela 7: Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da marcação dupla p16/Ki-67 na triagem de mulheres HPV-positivas de acordo com os resultados citológicos. Adaptado de (37,42). ....	24
Tabela 8: Comparação entre a marcação dupla p16/Ki-67 e métodos de triagem em HPV positivas com citologia conhecida. Adaptado de (25,34,48,49).....	24
Tabela 9: Marcação dupla p16/Ki-67, testes de HPV e a sua relação em termos de especificidade e sensibilidade. Adaptado de (16,23,24,26–28,32,52). (p=ne: não especificado; vs.: versus) .....	27
Tabela 10: Comparação de vários métodos de triagem com genotipagem e p16/Ki-67. (12-HPV-HR+: positivo para tipo não 16/18; S: sensibilidade; E: Especificidade). Adaptado de Stoler et al. (20).....	31
Tabela 11: Dados belgas que permitem perceber os custos associados ao rastreio e diagnóstico. Adaptado de Tjalma et al. (57).....	34

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## Lista de Acrónimos.

AGC	Células Glandulares Atípicas
ASC	Células Pavimentosas Atípicas
ASC-US	Células Pavimentosas Atípicas De Significado Indeterminado
ASC-US+	Células Pavimentosas Atípicas De Significado Indeterminado Ou Mais Graves
>ASC-US	Mais Grave Que Células Pavimentosas Atípicas De Significado Indeterminado
ASC-H	Células Pavimentosas Atípicas, onde não pode ser excluída HSIL
AUC	Área sob a curva ROC
CCU	Cancro Do Colo Do Útero
CIN	Neoplasia Intraepitelial Do Colo Do Útero
CIN 1	Neoplasia Intraepitelial Do Colo Do Útero Grau 1
CIN 2	Neoplasia Intraepitelial Do Colo Do Útero Grau 2
CIN 3	Neoplasia Intraepitelial Do Colo Do Útero Grau 3
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
FDA	Food and Drug Administration
HC2	Captura Híbrida 2
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HSIL	Lesão pavimentosa de alto grau
HPV	Papilomavírus Humano
HPV-HR	Papilomavírus Humano de Alto Risco
LAST	Lower Anogenital Squamous Terminology Project
LBC	Citologia em meio líquido
LEEP	Loop Electrosurgical Excision Procedure
LSIL	Lesão Pavimentosa de Baixo Grau
LSIL+	Lesão Pavimentosa de Baixo Grau Ou Mais Graves
NE	Não especificado
NILM	Negative for Intraepithelial Lesion Or Malignancy
NS	Não específico.
PCR	Polymerase Chain Reaction
pRB	Proteína do Retinoblastoma
SPG	Sociedade Portuguesa De Ginecologia
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

# Capítulo 1: Introdução e Contextualização

## 1.1. Papilomavírus Humano e a Carcinogénese.

O Papilomavírus Humano (HPV), um vírus de DNA de cápsula icosaédrica e genoma circular, é transmitido por contacto direto, durante a relação sexual ou parto, potenciado pelo *shedding* assintomático. (1)

Podem ser divididos pelo seu potencial oncogénico em alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) e baixo risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 88). (1,2) As infeções persistentes por tipos de alto risco associam-se a neoplasia intraepiteliais de alto grau e carcinoma invasivo. (2) Dentro destes, os tipos 16 e 18 são os mais frequentes e implicam maior probabilidade de progressão, estimando-se que possam ser responsáveis por 70-75% dos carcinomas cervicais. (1,3,4) Em média, os carcinomas invasivos ocorrem 5-20 anos após a infeção e têm como percursos as neoplasias intraepiteliais do colo do útero (CIN). (2,5)

A infeção é mais comum nas mulheres com menos de 30 anos, apesar de nestas existir maior resolução espontânea. Com a idade a prevalência vai diminuindo e a persistência aumenta o risco de carcinogénese. (5)

Infeção por HPV não é fator suficiente para a carcinogénese, e outros fatores contribuem para a progressão neoplásica como, por exemplo: a hereditariedade, a infeção por HIV, a imunossupressão ou o tabagismo. (1,2)

O ciclo de replicação do HPV relaciona-se com o ciclo de vida dos queratinócitos e células epiteliais. Geralmente é assintomático. (1)

Para que o processo de carcinogénese possa ocorrer é necessário ultrapassar uma série de barreiras, como o sistema imunológico ou o controlo da proliferação celular. O HPV infeta células basais do epitélio onde pode permanecer latente e iniciar a sua replicação com a diferenciação celular. (2) A infeção passa por uma fase produtiva, com expressão basal controlada de genes E6 e E7. Com a diferenciação celular observa-se alta expressão de genes virais em células diferenciadas e replicação do genoma no núcleo da célula infetada. As novas partículas virais são libertadas com a desintegração de queratinócitos na superfície. A fase transformativa, não produtiva, é marcada por uma intensa e descontrolada expressão de genes E6 e E7. (6) Lesões LSIL associam-se a uma

fase de infeção produtiva e lesões HSIL a uma fase transformativa, podendo associar-se maior risco oncológico ao último caso. (2,6)

## **1.2. Cancro do Colo do útero.**

O cancro do colo do útero (CCU) tem reconhecido o HPV como fator causal necessário, mas não suficiente para o seu desenvolvimento. Facto com implicações futuras e em termos de prevenção que se reflete, por exemplo na vacinação profilática. (3)

Em 2018 registou-se a nível mundial uma incidência de 596.8/100000 mulheres e uma mortalidade de 311.4/100000 mulheres, estando entre os 10 tipos de cancro mais comuns no mundo. Em algumas regiões, nomeadamente países em desenvolvimento, é uma das três principais causas de morte. (7)

Numa fase inicial, o cancro do colo do útero é assintomático, pelo que citologia anormal pode ser o primeiro alerta, contudo, a existência de uma citologia sem alterações não é impeditiva de investigação, principalmente na presença de sintomas. No caso de carcinoma invasivo pode existir hemorragia vaginal anormal, na forma de coitorragias, com mulheres sexualmente inativas a permanecerem assintomáticas até estádios mais tardios. Sintomas acompanhantes de dor pélvica, sensação de peso, sintomas urinários e/ou retais apontam para estádios mais avançados. (3)

O cancro do colo do útero é raro antes dos 20 anos de idade. (5,8)

O colo do útero divide-se em ectocervix, zona intravaginal revestida de epitélio pavimentoso, e canal endocervical revestido por epitélio colunar. A maioria das neoplasias têm origem na zona de transformação. (9) As lesões precursoras são as displasias, fundamentalmente as de alto grau, que podem progredir para cancro invasivo. (2) A realização de citologias cervicais permite a deteção precoce de CCU e das suas lesões precursoras. (1,8)

## **1.3 Rastreio do CCU.**

A primeira identificação de uma lesão precursora do CCU deu-se em 1901. (5) Inicialmente, a atenção estava na elevada incidência da doença e verificou-se uma redução significativa da morbimortalidade com a implementação do rastreio citológico. Atualmente, as preocupações focam-se na morbilidade do rastreio. (5) A incidência e a mortalidade têm mais impacto em mulheres não rastreadas corretamente. (8)

Em 2016, em Portugal, o rastreio do CCU atingiu uma taxa de cobertura geográfica de 76%, com uma diminuição do número de mortes de 247 para 201 entre 2011 e 2015. (10)

A Sociedade Portuguesa de Ginecologia (SPG) recomenda o início do rastreio organizado aos 25 anos, com citologia a cada 3 anos até aos 30 anos e a partir dos 30 até aos 65 anos com teste de HPV-HR com citologia reflexa a cada 5 anos. Na sua ausência, recomenda rastreio oportunista, com citologia a cada 3 anos a partir dos 21 anos e/ou 3 anos após a coitarca e teste de HPV-HR com citologia reflexa depois dos 30 anos a cada 5 anos. (5) A maioria das recomendações internacionais recomenda o rastreio entre os 21 e os 65 anos, com citologia de 3 em 3 anos nas mulheres com <30 anos e rastreio entre os 30 e os 65 anos de 3 em 3 anos com citologia isolada ou, então, teste de HPV-HR ou co-teste de 5 em 5 anos. Estas recomendações baseiam-se no facto de antes dos 21 anos o cancro do colo do útero ser muito raro e as suas lesões percussoras terem alta taxa de regressão espontânea. O fim do período de rastreio aos 65 anos tem por base a existência de uma rastreio anterior adequado, definido como: “3 resultados citológicos negativos consecutivos ou 2 resultados de co-testes negativos consecutivos dentro de 10 anos antes da interrupção do rastreio, com o teste mais recente ocorrido dentro de 5 anos.” (8)

Em Portugal, a população abrangida pela vacinação contra o HPV começa a entrar na faixa etária recrutada para o rastreio organizado, pelo que se impõe o repensar das estratégias de rastreio. (10) Mulheres vacinadas devem continuar no rastreio, uma vez que ainda não se comprovou que a vacinação reduza a sua necessidade. (5,8) De facto, apesar da vacina ser útil na prevenção dos genótipos 16 e 18, responsáveis pela maioria dos casos de CCU, não permite a ausência de rastreio. As razões para este facto prendem-se, por um lado, com a existência de muitas mulheres não vacinadas e da vacina não conferir proteção para todos os tipos de HPV oncogénicos. Por outro lado, mesmo no caso de existir vacinação, não existe proteção se ocorreu infeção anterior. Para além disto, a história vacinal pode ser difícil de obter. A diminuição da frequência dos tipos mais virulentos pode, sim, levar à diminuição do risco associado a um resultado positivo no rastreio, com necessidade de avaliação de novos métodos, já que é plausível que a performance dos testes existentes possa mudar. (11) Tal verifica-se para a citologia em mulheres vacinadas, que sofre uma perda significativa na sensibilidade e valor preditivo positivo. (5)

### 1.3.1. Testes de Rastreio.

Como testes de rastreio temos: a citologia convencional ou em meio líquido, o teste de HPV ou uma combinação de citologia e teste de HPV. (5)

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

A citologia em meio líquido (ThinPrep® e SurePath®) ganhou espaço pelas suas vantagens, permitindo a realização de lâminas mais homogêneas e de mais fácil leitura, e permite a realização de testes adicionais no caso de infeção por HPV, Clamídia e/ou Neisseria. (5) Entre os Teste de HPV existentes temos os baseados em:

- DNA viral: digene® HC2 HPV DNA, Abbott RealTimeHR-HPV, Cobas®HPV, Cervista®HPV-16/18, LINEAR ARRAY® HPV; (12)
- mRNA das proteínas E6 ou E7: APTIMA®HPV. (12)

Dentro destes existem testes que permitem a deteção de 14 genótipos, com genotipagem dos tipos 16 e 18, tal como: Cobas®HPV, Cervista®HPV16/18 ou Abbott RealTimeHR-HPV e, por outro lado, testes que identificam genótipos individuais como: LINEAR ARRAY® HPV. (12) Nas guidelines portuguesa são apenas descritos: QUIAGEN®HC2; CERVISTA®HPV-HR; CERVISTA®HPV-16/18; Cobas®; GenProbe APTIMA® e HOLOGIC APTIMA®. (5)

Os consensos da SPG não recomendam o Teste HPV como teste primário em mulheres com menos de 30 anos, devido à elevada prevalência de infeção pelo vírus naquelas idades. Neste contexto, a existência de um teste positivo não implica a existência de lesão de alto grau, com necessidade de um teste adicional, como a citologia, que permita selecionar as mulheres que, de facto, têm indicação para colposcopia. (5)

A associação da citologia ao teste de HPV (co-teste), aumenta a sensibilidade do rastreio, contudo a sua utilização no rastreio organizado não é consensual pelo aumento de custos, o que a tornam pouco custo-efetiva. De ressaltar que se ambos forem negativos existe um probabilidade muito baixa de se desenvolver lesão de alto grau. (5)

O teste Cobas®HPV foi aprovado pela FDA para rastreio primário. (13) O teste de HPV, como teste molecular, à partida apresenta-se como um método primário mais preciso e custo-efetivo. Esta estratégia de rastreio já é utilizada em países como a Austrália ou países europeus. (14)

### 1.3.2. Terminologia: Citologia.

Os relatórios citológicos devem seguir o Sistema de Bethesda, atualizado em 2014. (5,15) Deve indicar-se qual o método escolhido (citologia em meio líquido, citologia convencional ou outro) e se a amostra é satisfatória ou não para avaliação. (15)

Na interpretação podemos ter uma amostra NILM (“Negative For Intraepithelial Lesion Or Malignancy”), podem existir achados não neoplásicos (por exemplo, alterações reativas), ser descritos organismos (*Trichomonas vaginalis*, organismos consistentes com *Cândida spp.* alterações consistentes com Vaginose Bacteriana, entre outros) e serem descritas células endometriais. (15)

Tabela 1: Anomalias celulares epiteliais. Adaptado de (15).

Alteração:	Subtipos:	Inclui:
ASC: Células pavimentosas atípicas.	ASC-US: de significado indeterminado ASC-H: não pode ser excluída HSIL.	
LSIL: Lesão pavimentosa intraepitelial de baixo grau.		-HPV, -displasia leve, -CIN1.
HSIL: Lesão pavimentosa intraepitelial de alto grau.	Com características suspeitas de invasão.	-displasia moderada e grave, -carcinoma <i>in-situ</i> , -CIN2, -CIN3.
Carcinoma pavimento-celular.		

Tabela 2: Anomalias celulares glandulares. Adaptado de (15).

Alteração	Subtipos
Células Atípicas:	-Endocervicais, não especificado (NOS) ou especificado em comentário, -Endometriais, NOS ou especificado em comentário, -Glandular, NOS ou especificado em comentário.
Células Atípicas:	-Endocervicais, a favor de neoplasia, -Endometriais, a favor de neoplasia, -Glandular, a favor de neoplasia.
Adenocarcinoma <i>in situ</i> endocervical.	
Adenocarcinoma:	- endocervical, - endometrial, - extrauterino, - NOS.

Deve ainda ser indicado, se for o caso, a existência de outras neoplasias, testes adjuvantes utilizados, se foi utilizada interpretação assistida por computador ou ser adicionados comentários ou notas.(15)

### 1.3.3. Terminologia: Histologia.

No diagnóstico histológico, na Colposcopia, deve ser utilizada a classificação LAST (“The Lower Anogenital Squamous Terminology Project”), contudo a classificação baseada em Richart está mais difundida e ambas podem ser utilizadas.(5)

Classificação baseada em Richart	Classificação LAST
Colo do Útero	
CIN 1: Neoplasia intraepitelial de grau 1 CIN 2: Neoplasia intraepitelial de grau 2 CIN 3: Neoplasia intraepitelial de Grau 3 CIS: Carcinoma in-situ Carcinoma microinvasivo	LSIL: low-grade squamous intraepitelial lesion HSIL:high-grade squamous intraepitelial lesion  Carcinoma escamoso superficialmente invasivo

Figura 1: Classificação de Richart e Classificação LAST. Retirado de (5).

### 1.3.4. Considerações sobre os Resultados Citológicos.

De seguida, apresenta-se uma breve exploração das recomendações portuguesas da Sociedade Portuguesa de Ginecologia para a orientação de resultados citológicos e seguimento pós-tratamento. (5)

Se existir um resultado com Citologia negativa e teste HPV positivo, a abordagem não é consensual já que podemos estar a intervir numa infeção transitória. (5) Se idade  $\geq$  30 anos pode optar-se por: (5)

- Genotipagem - se positiva para genótipos 16 e/ou 18, existe indicação colposcopia; (5)
- Repetição do co-teste após 12 meses - se teste de HPV se mantiver positivo ou existir citologia ASC-US+, existe indicação para colposcopia.(5)

A ASC-US é a alteração mais frequente, mas de mais baixo risco para CIN3+, relacionando-se com processos inflamatórios e atróficos. (5) De acordo com a idade: (5)

- <25 anos - abordagem menos interventiva possível; (5)
- $\geq$ 25 anos - um teste HPV positivo é indicação para colposcopia; (5)

Os casos ASC-H apresentam uma prevalência de lesões CIN2+ entre 50-70%, em especial se idade  $\geq$ 30 anos. Existe uma alta positividade para HPV-HR e, portanto, não tornando adequado o teste de HPV. Há indicação para colposcopia em todas as mulheres, mesmo se negativas para HPV-HR. (5)

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

A LSIL, apresenta CIN2+ em 10% a 20% dos casos, diminui em número com o avançar da idade e regride na maioria das vezes de forma espontânea. A maioria é positiva para HPV. (5) Se idade  $\geq$  25 anos e: (5)

- HPV positivo ou desconhecido - colposcopia em todos os casos. (5)
- HPV negativo – co-teste aos 12 meses. Se aqui a citologia for ASC-US+ e/ou teste de HPV positivo, existe indicação para colposcopia. (5)

Na HSIL está recomendada colposcopia em menos de 4 semanas em todas as mulheres independentemente do teste de HPV ou da idade. A maioria é HPV positiva. (5)

Nos casos com citologia negativa e HPV positivo, ou citologia LSIL, é mencionada a possível utilidade de p16/Ki-67. (5)

No acompanhamento pós-tratamento de CIN1, CIN2 e CIN3 recomenda-se (5):

- CIN1 - acompanhamento durante 12 meses e preferencialmente co-teste aos 12 meses. (5)
- CIN2/3 – acompanhamento durante 24 meses, com citologia, colposcopia e, no caso de margens positivas, estudo do endocolo aos 6 meses. Se estes forem negativos recomenda-se co-teste aos 12 e 24 meses. (5)

As citologias com células glandulares atípicas (ACG), podem ser resultado de patologia benigna do útero. Em geral associa-se a alterações pavimentosas. Apesar de uma elevada prevalência de HPV-HR nestas lesões, um teste negativo identifica maior risco de cancro do endométrio, mais comum nas mulheres mais velhas, mas não permite excluir doença cervical pavimentosa, presente numa porção expressiva dos casos. (5) As recomendações para estas lesões na citologia são as seguintes:

- AGC: recomenda-se colposcopia, estudo da cavidade endometrial e dos anexos. (5)
- AGC endometrial: estudo da cavidade endometrial e do endocolo e exclusão de patologia anexial. Se não existir patologia do endométrio, recomenda-se de seguida colposcopia. (5)
- AGC Endocervical: recomenda-se colposcopia, curetagem endocervical, teste de HPV, ecografia pélvica, estudo do endométrio ( $\geq$ 35 anos ou alterações menstruais). (5)

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

É preciso ter em atenção que os resultados do rastreio podem ter impacto psicológico na mulher e que resultados falso-positivos têm como consequência tratamentos desnecessários, tal como uma colposcopia sem indicação tem um risco de biopsias desnecessárias e tratamentos adicionais. (5,8) Devem evitar-se procedimentos dispensáveis, sobretudo em mulheres mais jovens pelo impacto numa gravidez e/ou colposcopias futuras. (12) Um resultado negativo num teste com alta sensibilidade pode excluir doença e a especificidade permite prevenir tratamentos excessivos e seus efeitos secundários, falsos positivos e redução dos custos. (16–19)

Na prevenção do CCU é importante o diagnóstico e tratamento de CIN3, procurando-se a maior deteção de CIN3+ na primeira ronda do rastreio. (20) O foco do rastreio deve ser as lesões de CIN2+. (9)

Pelas várias questões que ainda se colocam no rastreio, torna-se importante avaliar novas formas de triagem que possam ser aplicáveis no rastreio do CCU. (5,8,12) Assim, avalia-se o potencial papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 (CINtec®PLUS) no rastreio do CCU.

## Capítulo 2: Objetivos.

Nesta monografia pretende-se:

- Fazer uma descrição da técnica CINtec®PLUS (p16INK4a/Ki-67 dual stain), da sua execução, indicações e limitações;
- Avaliar a utilidade como método primário de Rastreio do CCU;
- Avaliar a utilidade como método reflexo a um teste de HPV positivo;
- Avaliar a utilidade como método reflexo a um teste de HPV positivo e citologia NILM, ASC-US e LSIL;
- Avaliar a utilidade como método reflexo de citologia e HPV desconhecido;
- Avaliar a utilidade em lesões não pavimentosas;
- Avaliar a sua performance em relação com a infeção por *Chlamydia trachomatis*.

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## **Capítulo 3: Material e Métodos.**

Recorreu-se a uma pesquisa realizada entre junho de 2019 e fevereiro de 2020, nas bases de dados: Pubmed e Willey Online Library. Consideraram-se, apenas, artigos publicados nos últimos 10 anos. A seleção foi baseada numa primeira fase no título ou abstract e numa segunda fase na leitura do artigo. Foram selecionados os artigos considerados mais relevantes para a exploração do tema.

As palavras-chave utilizadas foram: “Human Papillomavirus”; “Cervical Cancer”; “p16”; “p16INK4a”; “Ki-67”.

Recorreu-se ainda a material online do fabricante do CINtec®PLUS, a guidelines portuguesas da Sociedade Portuguesa de Ginecologia (SPG) e internacionais da US Preventive Services Task Force e material da FIGO. Em relação a livros utilizaram-se livros da especialidade de Ginecologia e Microbiologia e da Classificação de Bethesda. Foi, ainda, utilizada uma tese de mestrado portuguesa.

À data de conclusão deste trabalho foi consultada a atualização da aprovação do método para uso clínico pela FDA.

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## **Capítulo 4: Desenvolvimento.**

### **4.1 Descrição da técnica de CINtec®PLUS (p16INK4a/Ki-67 dual stain).**

A marcação dupla p16/Ki-67 pode ser realizada em amostras em meio líquido no rastreio de rotina, com estudos em amostras de ThinPrep® e SurePath®, e amostras convencionais apesar de ausência de comparação direta com amostras em meio líquido. (16,21–29)

O CINtec®PLUS consiste num ensaio de imunocitoquímica que permite a co-deteção das proteínas p16INK4a (p16) e Ki-67 em esfregaços cervicais. Na presença de p16 observa-se um citoplasma ou núcleo de coloração castanha e na presença de Ki-67 um núcleo de coloração vermelha. Em condições normais não ocorre a sua expressão simultânea que, caso se verifique num esfregaço cervical, indica a desregulação do ciclo celular por infeção de HPV-HR persistente e em transformação, ajudando a identificar mulheres com doença cervical de alto grau. (30)

Quando há paragem do ciclo celular a proteína do retinoblastoma (pRb) encontra-se ligada ao fator de transcrição E2F, complexo (pRb:E2F) que impede a progressão do ciclo celular. A sua dissociação permite a progressão do ciclo celular e a mitose, com ativação do gene p16 e expressão da proteína p16. Esta, por sua vez, desencadeia uma serie de eventos com reassociação do complexo, nova paragem do ciclo celular e fim da expressão de p16. (30)

Na infeção transitória por HPV apesar de ser possível existir proliferação celular e atipia, não existe disrupção entre pRb e E2F ou da expressão de p16. Nas infeções persistentes por HPV-HR, em progressão, com elevada produção de oncoproteínas E6 e E7, a oncoproteína E7 liga-se a pRb impedindo a associação a E2F, comprometendo a paragem do ciclo celular, com proliferação contínua. P16 passa a ser sobre expressa e detetável por imunocitoquímica. (30)

Ki-67 é um marcador de proliferação celular detetado apenas no núcleo de células em divisão. (30) Para distinguir células ocasionalmente positivas para p16, a combinação com Ki-67 permite identificar células cervicais transformadas pelo HPV, auxiliando na distinção de células epiteliais normais ou lesões reativas. (4,6)

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

A deteção isolada de p16 ou Ki-67 pode ocorrer na infeção produtiva do HPV, e representa um resultado negativo. A p16 pode ser expressa em células em divisão celular e a expressão de Ki-67 pode ocorrer em células normais endocervicais ou morfológicamente anormais. (30)

Em março de 2020, a FDA publicou indicações para o uso do CINtec®PLUS no rastreio do CCU. Segundo estas, a colheita da amostra deverá ser realizada em meio de ThinPrep®, com possível utilização do sistema de coloração BenchMark ULTRA e avaliação por patologista especializado. Está indicado em conjunto com o teste de HPV Cobas® 4800, na avaliação da necessidade de colposcopia nos cenários apresentados na tabela 3. (31)

Tabela 3: Indicações aprovadas por idade. Adaptado de (31).

Idade		Indicações de utilização
25-65 anos	Rastreio primário de HPV.	<ul style="list-style-type: none"><li>• positivas para 12 tipos de HPV-HR.</li></ul>
		<ul style="list-style-type: none"><li>• positivas para HPV16/18;</li></ul> (Avaliação conjunta com os antecedentes da doente e guidelines existentes).
30-65 anos	Rastreio com citologia cervical e teste de HPV-HR.	<ul style="list-style-type: none"><li>• NILM e positivas para 12 tipos de HPV-HR;</li></ul>
		<ul style="list-style-type: none"><li>• NILM e HPV16/18 positivas;</li></ul> (Avaliação conjunta com os antecedentes da doente e guidelines existentes).

A interpretação de p16/Ki-67 é independente da morfologia celular. (23,32) Segundo um estudo de 2015, este método pode realizar-se manualmente, em poucas horas, com baixa necessidade de equipamento técnico e é positiva se presente em  $\geq 1$  células. (22)

#### 4.1.1. Automatização.

A citologia em meio líquido possibilita o uso de sistemas automatizados, que podem estender-se ao CINtec®PLUS. (5,25) Schmidt et al. considera que a positividade com  $\geq 1$  células duplamente marcadas sem avaliação morfológica pode ajudar na automatização do método em lesões pavimentosas. (23)

Costa, nas suas conclusões, teoriza que a automatização com Ventana®BenchMark poderá melhorar a reprodutibilidade e questões técnicas. (12) Com esta ferramenta, Ovestad et al., avaliaram o desempenho da marcação dupla, a partir de um protocolo totalmente automatizado de auto-coloração, numa população HPV positiva com citologia normal, ASC-US ou LSIL, na deteção de CIN2/3. O uso de p16/ki-67 mostrou-se mais

sensível, mas menos específico que a citologia. Contudo, a associação de ambos permitiu uma especificidade superior, propondo-se o uso de p16/Ki-67 como complemento à citologia. (33) Esta ferramenta é, também, utilizada em McMennamin et al. onde a marcação dupla apresentou bons resultados na triagem de mulheres HPV positivas. (34)

Vários estudos utilizam uma ferramenta automatizada de auto-coloração diferente: o “Dako autostainer”. (16,35–38)

Gertych et al. utilizaram uma técnica automatizada de reconhecimento de imunorreatividade, nomeadamente do núcleo celular, e comparam os resultados obtidos com avaliações por citopatologistas. A correlação foi boa e postulou-se que poderá existir um possível impacto no rastreio, já que técnicas manuais podem estar associadas a sensibilidade inferior e maior variabilidade. (39)

#### 4.1.2 Reprodutibilidade.

Em meio de SurePath®, Wentzsen et al. (2014) em mulheres HPV positivas, observaram uma reprodutibilidade boa a excelente para p16/Ki-67 nos avaliadores com treino recente e sem experiência, cujo desempenho foi quase similar aos profissionais de referência. Também a sensibilidade e a especificidade foram semelhantes nos dois grupos. Não se observaram diferenças na reprodutibilidade entre citologias NILM ou ASC-US+ ou entre mulheres com <40 anos e ≥40 anos e concordância aumentou com o número de células positivas. Neste estudo, com o intuito de avaliar a marcação dupla em contexto de rotina, considera-se que o desempenho dos avaliadores poderá aumentar com a experiência. (35)

Em meio de ThinPrep®, Allia et al. num rastreio primário de HPV, encontraram para p16/Ki-67 uma boa reprodutibilidade e especificidade na triagem de mulheres HPV positivas, com concordância semelhante entre a interpretação de especialistas e não especialistas em citologia cervical e entre as categorias citológicas. Neste estudo, considera-se que a interpretação pode ser realizada após um curto período de treino, mesmo em pessoas sem experiência na interpretação de citologia cervical, com treino seriado rápido, simples e menos dispendioso do que treinar especialistas em citologia. (40) McMennamin et al, numa população semelhante, avaliaram a reprodutibilidade inter e intraobservador da marcação dupla e concluíram que pode ser facilmente adotada em laboratórios que utilizam ThinPrep®. (41)

No mesmo meio, Benevolo et al. na avaliação da reprodutibilidade interobservador em mulheres HPV positivas, observaram que uma menor concordância entre lâminas se

associava a: menor número de células marcadas, células sobrepostas ou coloração fraca. A reprodutibilidade entre profissionais com experiência foi superior, mas não aumentou numa segunda avaliação com as lâminas mais discordantes. A concordância foi maior nas lâminas positivas e negativas e quase nula nas inconclusivas. O estudo envolvia vários laboratórios e a reprodutibilidade foi boa, com concordância dentro do laboratório superior à concordância geral. Benevolo et al. consideram, no entanto, que no imediato pode não existir um aumento marcado da reprodutibilidade de p16/Ki-67, quando em substituição da citologia, mas esta pode ser obtida com menos esforço. (40)

No caso de mulheres com LSIL, Waldstrøm et al. em meio de ThinPrep®, reportaram que a reprodutibilidade inter e intraobservador, apesar de apenas aceitável, melhorou após treino. (16)

#### 4.1.3 Limitações.

A avaliação das lâminas pode ser limitada pela alteração da coloração, associado ao armazenamento prolongado. (18,32,37) Estudos reportam exclusão de amostras devido a: material residual insuficiente ou baixa celularidade, por material insuficiente para preparar uma lâmina adicional, que pode ocorrer caso se realizarem, anteriormente, testes a partir da amostra ou no caso de amostras armazenadas. (16,18,22–25,32) A disponibilidade de material residual pode melhorar com o treino. (29) A recolha antes da colposcopia também pode comprometer a amostra. (18) Em relação à citologia convencional, existem limitações específicas do protocolo de remoção da coloração em esfregaços arquivados. (32)

Costa, no seu trabalho, atribui a sensibilidade abaixo do esperado à utilização de lâminas pré-existentes com perda de grupos celulares e, no caso de lâminas novas, todos os testes avaliados foram realizados a partir da mesma amostra, a partir de material residual, com perda de representatividade. A idade das amostras também influencia a sua qualidade. (12)

Por outro lado, não se pode excluir que o armazenamento contribua para a perda de antigenicidade e degradação do mRNA, com impacto na sensibilidade, relatado em Waldstrøm et al. com amostras de ThinPrep® armazenadas à temperatura ambiente. (16)

A avaliação das amostras foi, ainda, condicionada pela dificuldade em distinguir a coloração p16 da reação de fundo, quando é pouco intensa, e pelas dificuldades impostas por grupos de células tridimensionais ou metaplásicas, num estudo com meio de SurePath®. (28) Diferente das amostras de ThinPrep®, que permitem uma monocamada,

as lâminas preparadas a partir de SurePath® são mais tridimensionais com aglomerados com sobreposição significativa que prejudicam a avaliação, obscurecendo células coradas e dificultando a interpretação de células pavimentosas e endocervicais. (17) Em Wentzensen et al. (2015) a utilização de SurePath® foi promissora. (37)

Areán-Cuns et al. relataram casos de HSIL positivos para p16/Ki-67 cuja biopsia foi normal, que poderiam corresponder a possíveis erros na amostra (foco de HSIL pequeno não detetado na biopsia). (42) Falsos positivos associam-se a infeções esporádicas e intermitentes por HPV e os falsos negativos ligam-se à qualidade da amostra (meio líquido vs. convencionais) ou, então, a células displásicas cujas alterações não são ainda irreversíveis. (38)

Por sua vez, células metaplásticas e células endocervicais podem apresentar coloração isolada para p16 ou Ki-67, respetivamente, e exigem avaliação morfológica para as excluir. (17) Na inflamação aguda também pode existir expressão de Ki-67, com extensa atividade cromogénica e em alterações glandulares a intensidade da coloração p16 pode apresentar-se variável. (17,43)

Na avaliação de alterações glandulares também se verificou baixa celularidade, em amostras utilizadas anteriormente e com baixo material residual, e os casos inconclusivos ocorreram em amostras mais antigas conservadas a temperatura ambiente. (43)

## **4.2 P16/Ki-67 no Rastreio do CCU.**

A avaliação independente da morfologia celular torna o p16/Ki-67 menos subjetivo que a citologia, embora sejam semelhantes em termos de execução e avaliação subjetiva. (20) Isoladamente, a sensibilidade da citologia é baixa, mas é muito específica, em especial se >ASC-US. (5,20) Ambos parecem ter uma boa concordância com a histologia. (38)

A marcação dupla e o teste de HPV podem ser realizados a partir da mesma amostra de citologia. (27) O teste de HPV é positivo mesmo numa infeção transitória, já a marcação dupla é apenas positiva quando há desregulação do ciclo celular e não é tão objetiva como o teste de HPV. (12,32) O teste de HPV têm elevada sensibilidade, mas uma especificidade limitada, com mais referências a colposcopia. (12,24–26,32)

Costa, na sua investigação, determinou que, no uso de p16/ki-67, pode seguir-se o limiar recomendado de  $\geq 1$  células positivas. (12) Com o aumento deste limiar, em Wentzensen et al. (2015) a sensibilidade foi significativamente menor e o VPP aumentou

significativamente. (37) Em Uijterwaal et al, com um limiar  $\geq 5$  células a sensibilidade para CIN2+ também diminuiu, e apesar de uma especificidade superior face ao limiar original, também registada em Wentzensen et al., um número relevante de lesões significativas não foi detetado, não se admitindo uma melhoria face ao limiar original, nem o seu ajuste. (32,37) Em Polman et al., num contexto de vigilância pós-tratamento para CIN2/3, onde é relevante uma elevada sensibilidade, o aumento dos limiares de positividade não refletiu um aumento da performance, com sensibilidade inferior, apesar de especificidade superior e menor taxa de colposcopias. (18)

Estudos apontam que a positividade para p16/Ki-67 aumenta com a severidade citológica e histológica. (13,25,32,37,44,45)

Ikenberg et al. encontrou variabilidade na sensibilidade e especificidade de acordo com os métodos de citologia utilizado (Convencional, ThinPrep®, SurePath®). O uso de p16/Ki-67 atenuou a variabilidade, na sensibilidade e especificidade, observada. (21)

#### 4.2.1 P16/Ki-67 como método primário de rastreio.

Ikenberg et al. mostra que um teste único com expressão de p16/Ki-67 está associado a um alto risco de deteção de CIN de alto grau. Neste estudo, a prevalência de p16/Ki-67 positivo foi comparável à existência de citologia ASC-US+, mas metade da prevalência de HPV. A positividade foi superior no grupo com  $<30$  anos. Este grupo representou apenas 25% da população, mas apresentava quase 40% das lesões CIN2+ e CIN3+ diagnosticadas. Contudo, nestas mulheres, a especificidade do teste de HPV seria inferior a 80%, confirmando a sua utilidade clínica limitada. (21)

O uso isolado de p16/ki-67 mostrou alta sensibilidade e especificidade na deteção de CIN2+ em Ikenberg et al. e Zhang et al. (Tabela 4) e alto VPN em Ikenberg et al. (21,26)

Em relação à citologia, Ikenberg et al. observaram um aumento de 18% na sensibilidade para CIN2+ com o uso de p16/Ki-67, cuja sensibilidade foi significativamente superior na deteção de CIN2+, independentemente da idade, e na deteção de CIN3+, exceto em mulheres com  $<30$  anos. No geral, a especificidade foi comparável (CIN2+) ou superior (CIN3+), mas por idade significativamente superior apenas no grupo com  $<30$  anos na deteção de CIN3+, sem diferença estatística no grupo com  $\geq 30$  anos. (21) Zhang et al. registaram sensibilidade e especificidade comparáveis para CIN2+. (26)

Em relação ao teste de HPV, a dupla marcação mostrou sensibilidade significativamente inferior em Ikenberg et al. e não significativamente inferior em Zhang et al., na deteção de CIN2+. (21,26) Por sua vez, a sua especificidade foi significativamente superior para CIN2+ e CIN3+, sendo possível uma redução de 50% nos falsos positivos em mulheres com  $\geq 30$  anos. (21,26) (Tabela 4)

Tabela 4: Relação entre a marcação dupla p16/Ki-67 e a citologia e teste de HPV como rastreio primário. Adaptado de (21,26). (ne: não especificado).

Estudo	Teste de comparação	Idade (anos)	Lesão	Sensibilidade (p16/Ki-67 vs. teste de comparação)	Especificidade (p16/Ki-67 vs. teste de comparação)
Ikenberg et al. (21)	HC2	$\geq 30$	CIN2+	84.7% vs. 93.3% (p=0.03)	96.2% vs. 93.0% (p<0.001).
			CIN3+	87.2% vs. 96.2% (p=0.05)	95.9% vs. 92.7% (p<0.001)
	Convencional, ThinPrep®, SurePath®.	$\geq 18$	CIN2+	86.7% vs. 68.5% (p<0.001)	95.2% vs. 95.4% (p=0.15)
			CIN3+	87.4% vs. 73.6% (p=0.02)	94.8% vs. 95.1% (p=0.03)
Zhang et al. (26)	Cobas® 4800	$\geq 20$	CIN2+	90.18% vs. 93.87% (p=0.286)	68.33% vs. 21.67% (p<0.001)
	ThinPrep®			90.18% vs. 83.44% (p=0.108)	68.33% vs. 38.33% (p=0.088)

Em Zhang et al., o VPP de p16/Ki-67 foi superior ao apresentado para a citologia e teste de HPV, apesar de não significativo. Já o VPN mostrou-se significativamente superior à citologia e teste de HPV na deteção de CIN2+ e a AUC de p16/Ki-67 foi significativamente superior à da citologia e teste de HPV-HR. (26)

Um estudo de 2015 realizado no Kenya, apontou uma positividade para p16/Ki-67 inferior ao teste de HPV, nomeadamente em mulheres com histologia normal ou citologia negativa, com menos falsos positivos. A positividade para p16/Ki-67 ocorreu principalmente entre os 36 e os 40 anos e esteve ausente em mulheres com <21 anos. A Inspeção por Ácido Acético e Iodeto de Lugol foi apenas positivo em 30% das citologias HSIL. Apesar da limitação do número da amostras, o uso de p16/Ki-67 produziu uma taxa de deteção de CIN2+ semelhante ao teste de HPV. Um ponto relevante passa por a associação com ThinPrep® poder ser economicamente desfavorável num contexto de poucos recursos. (22)

Na vigilância pós-tratamento de CIN de alto grau, onde é necessária alta sensibilidade pelo risco de recorrência de CIN2+, o uso de p16/ki-67, em relação à citologia ou teste de HPV-HR, apresenta uma especificidade superior, mas ligeira diminuição na sensibilidade. Contudo, a abordagem combinada (p16/Ki-67 com teste de HPV) seria uma alternativa ao co-teste no *follow-up*, com sensibilidade comparável, especificidade significativamente superior, maior VPP e menos referenciações. Os carcinomas não detetados pela marcação dupla seriam identificados pela combinação com teste de HPV. (18)

#### 4.2.2 P16/Ki-67 como método reflexo de teste de HPV positivo.

Num estudo de 2016, verifica-se uma associação forte entre p16/Ki-67 e persistência de HPV-HR, com expressão significativamente superior no grupo com infeção persistente. (13) Por outro lado, estudos observam que apenas parte dos casos HPV positivos parecem apresentar lesão significativa em colposcopia, com apenas 33.6% das mulheres HPV-positivas a apresentarem CIN2+ em Areán-Cuns et al. (42,45)

Tabela 5: Relação entre a marcação dupla p16/Ki-67, citologia e genotipagem de HPV16/18 na triagem de HPV positivas. Adaptado de (26,37,42,46). (LBC: Citologia em meio líquido; es: esteticamente significativo)

Estudo	Lesão	Teste de Comparação	Sensibilidade (p16/Ki-67 vs. teste de comparação)	Especificidade (p16/Ki-67 vs. teste de comparação)
Wentzensen et al. (2015) (37)	CIN2+	SurePath®	83.4% vs. 76.6% (p=0.1)	58.9% vs. 49.6% (p<0.001)
Areán-Cuns et al. (42)	CIN2+	ThinPrep®	98.0% vs. 99.0% (p=ne)	39.1% vs. 6.9% (p=ne)
Zhang et al. (26)	CIN2+	ThinPrep®	90.85% vs. 83.01% (p=0.065)	70.21% vs. 42.55% (p=0.007)
		Cobas® 4800 (HPV16/18)	90.85% vs. 70.59% (p<0.001)	70.21% vs. 44.68% (p=0.006)
Stanczuk et al. (46)	CIN2+	LBC	85.0% vs. 68.3% (p=0.0213)	76.7% vs. 89.1% (p<0.0001)
		Cobas® 4800 (HPV16/18)	85.0% vs. 61.7% (p=0.0060)	76.7% vs. 70.5% (p=0.0917)

Como método de triagem isolado (Tabela 5), e em comparação com a citologia, a marcação dupla regista, maioritariamente, sensibilidade semelhante e especificidade significativamente superior. (26,37,42) Em contrates, no caso de Stanczuk et al. a sensibilidade foi significativamente superior e a especificidade significativamente inferior, na deteção de CIN2+. (46)

Em comparação com a genotipagem de HPV16/18, a sensibilidade de p16/Ki-67 foi significativamente superior. (26,46) Por sua vez, a especificidade foi superior em Stanczuk et al. e significativamente superior em Zhang et al. (26,46)

No estudo de 2015 de Wentzensen et al., numa população positiva para HPV com  $\geq 30$  anos, o VPP (21.0%) e VPN (96.4%) de p16/Ki-67 foram significativamente superiores aos identificados para a citologia, na deteção de CIN2+ num período de 2 anos, e a positividade significativamente inferior à citologia (ASC-US+). (37) Do mesmo modo, também em Areán-Cuns et al. o VPN registado para p16/Ki-67 (97.5%) foi superior na deteção de CIN2+. (42)

Neste último estudo, a baixa especificidade encontrada (Tabela 5) foi associada à inexistência no estudo de mulheres HPV-negativas e à curta duração do *follow-up*. A concordância p16/ki-67/biopsia foi superior à concordância citologia/biopsia e um resultado positivo para p16/Ki-67 teria selecionado um menor número de mulheres para colposcopia, numa redução de 21.7% face à citologia, e pelo menos duas vezes mais lesões pré-malignas e CCU detetados. Apesar disso, registou-se CIN2+ em 2.5% dos casos HPV-positivo/p16/Ki-67-negativo e em casos HPV-positivo/p16/Ki-67-positivos a percentagem foi de 44.8%. Aqui, considera-se útil o uso de p16/Ki-67 como ferramenta complementar ao rastreio primário de HPV, não existindo referenciação em mulheres HPV-positivas/p16/Ki-67-negativas. (42)

Em Zhang et al., a AUC da marcação dupla, na deteção de CIN2+, foi significativamente superior à da citologia e genotipagem de HPV16/18 e a triagem de casos positivos para HPV-HR com p16/Ki-67 teria uma taxa de referenciação (76.5%) semelhante à citologia (77.0%). (26)

Em Stanczuk et al., o VPP mais elevado foi registado para a citologia e, por sua vez, a genotipagem de HPV16/18 registou o maior número de colposcopias. Nenhuma das opções isoladas de triagem (genotipagem HPV 16/18, citologia ou p16/Ki-67), satisfaz os critérios de risco para retorno ao rastreio (probabilidade de CIN2+  $< 2\%$  com resultado negativo). De seguida (tabela 6) apresentam-se algumas das abordagens sequenciais e combinadas exploradas neste estudo. (46)

Em relação às abordagens combinadas apresentadas (Tabela 6), as que incluíam realização de p16/Ki-67 foram significativamente mais sensíveis, contudo significativamente menos específicas que a triagem com citologia (ASC-US+). (46)

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreamento do câncer do colo do útero.

Nas abordagens sequenciais (Tabela 6), a maior sensibilidade e menor risco de CIN2+ pós-teste encontra-se na abordagem descrita na última linha da tabela 6, associada, no entanto, ao maior número de colposcopias e a especificidade inferior a todas as estratégias avaliadas (isoladas ou combinadas). De ressaltar, que a triagem sequencial com utilização de p16/Ki-67 em HPV16/18-negativas oferece um risco pós-teste que permite retorno ao rastreamento, caso a dupla marcação seja negativa. (46)

Tabela 6: Abordagem combinadas e sequenciais na triagem de HPV positivas, sensibilidade (S) e especificidade (E) para CIN2+ e número de colposcopias resultantes. Adaptado de Stanczuk et al. (46). (LBC: citologia em meio líquido, positiva se: ASC-US+).

Abordagem Combinada (co-teste)	S	E	Colposcopias
P16/Ki-67 + HPV16/18	95%	56.2%	521
P16/Ki-67 + LBC	90.0%	72.5%	376
HPV16/18 + LBC	93.3%	62.8%	463
P16/Ki-67+ HPV16/18 + LBC	98.3%	52.7%	556
Abordagem Sequencial	S	E	Colposcopias
HPV16/18 → Se negativa → LBC	93.3%	62.8%	463
HPV16/18 → Se negativa → P16/Ki-67	95.0%	56.2%	521
HPV16/18 → Se negativa → LBC → Se negativa → P16/Ki-67	98.3%	52.7%	556

Num contexto de rastreamento primário de HPV, Wentzensen et al. (2019) em meio de SurePath® mostrou, para a combinação de genotipagem de HPV16/18 com p16/ki-67, uma sensibilidade semelhante e especificidade significativamente superior à triagem de referência (genotipagem de HPV16/18 e citologia). Por sua vez, a triagem com p16/Ki-67 isolado mostrou uma sensibilidade ligeiramente inferior, em relação às estratégias combinadas, e superior à citologia e uma especificidade significativamente superior a todas as estratégias avaliadas, para todas as faixas etárias, na detecção de CIN2+ e CIN3+. A triagem de referência (referenciação se: HPV16/18 positivas ou não-HPV16/18 positivos com ASC-US+) mostrou o maior número de colposcopias imediatas: 9.7 colposcopias por CIN3+ detectado (colposcopias/CIN3+). A triagem com p16/Ki-67 e genotipagem de HPV16/18 (referenciação se ≥1 teste positivo) obteve 8.3 colposcopias/CIN3+, numa redução de 32.1%. Estratégias com p16/Ki-67 isolado registaram 7.7 colposcopias/CIN3+. (45)

O rastreamento primário de HPV requer a repetição, em 1 ano, do teste em mulheres positivas para HPV, mas negativas para HPV16/18 com citologia NILM. Neste cenário, após um ano, foram necessárias 32.2 colposcopias/CIN3+. Se esta fosse realizada em mulheres positivas para HPV16/18, mas p16/Ki-67 negativas, seriam necessárias 14.2

colposcopias/CIN3+. Neste estudo considera-se, assim, que o p16/Ki-67 pode ser utilizado em substituição da citologia e aponta que, em casos duplamente negativos (Genotipagem e p16/Ki-67), os intervalos de repetição de rastreio podem ser estendidos até 3 anos. (45)

Em McMenamin et al., também em contexto de rastreio primário de HPV, observou-se que limitar a referenciação a casos de citologia menor, positivos para HPV16/18 ou positivos para os restantes 12 tipos (não-16/18) mas com expressão de p16/Ki-67, reduziria a referenciação de forma significativa em 24%, enquanto que a referenciação de casos positivos para HPV com citologia negativa, mas com expressão de p16/Ki-67, conduziria a um aumento significativo nas referenciações de 18%, face à triagem de referência: a citologia. Neste estudo, recomenda-se um seguimento em um ano nos casos positivos para HPV sem expressão de p16/Ki-67. (34)

Regressando agora a Stanczuk et al., os diferentes testes de triagem (genotipagem de HPV16/18, citologia e p16/Ki-67) mostraram uma performance semelhante em mulheres HPV-HR positivas, em amostras de auto-colheita, com a diferença que a genotipagem de HPV16/18 mostrou especificidade inferior ao uso de p16/Ki-67. (46)

Para finalizar, Ebisch et al. avaliaram a marcação dupla numa população entre os 30 e 60 anos, recrutada para realização de citologia (ThinPrep®), a partir da qual se realizaram p16/Ki-67 e genotipagem, após positividade para HPV-HR (GP5+/6+) em auto-colheita. O teste de triagem de referência foi a citologia (ASC-US+) e não detetou 5 lesões CIN3. Neste estudo, o uso de p16/Ki-67 mostrou uma sensibilidade semelhante e uma especificidade superior à triagem de referência, com seis lesões CIN3 não detetadas. Na triagem com genotipagem de HPV16/18 verificaram-se dezanove casos CIN3 não detetados e uma taxa de referenciação de apenas 40%. Já a associação de p16/Ki-67 com a genotipagem de HPV16/18 mostrou uma sensibilidade e especificidade semelhantes à triagem de referência e apenas duas lesões CIN3 não detetadas. (47)

#### 4.2.3 P16/Ki-67 como método reflexo a HPV positivo e citologia conhecida.

Em Uijterwaal et al. (2014) em mulheres com citologia anormal (ASC-US/LSIL/ASC-H) HPV positivas, a prevalência de p16/Ki-67 foi de 78.9% versus 9.4% em HPV-negativas. (32) Em Wentzensen (2015), na triagem de mulheres NILM/HPV-positivas registou-se para p16/Ki-67 uma positividade de 31.6%. A sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para CIN2+ e CIN3+ podem ser consultados na tabela 7. (37)

Areán-Cuns et al., numa população HPV-positivas onde foi realizada citologia e p16/ki-67, os valores mais elevados de sensibilidade e VPN da dupla marcação foram

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

encontrados em casos NILM e as citologias NILM que registaram CIN2+ (6.7%) foram todas positivas para p16/Ki-67. Os valores podem ser consultados na tabela 7. (42)

Tabela 7: Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da marcação dupla p16/Ki-67 na triagem de mulheres HPV-positivas de acordo com os resultados citológicos. Adaptado de (37,42).

Estudo	Lesão	Histologia	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Areán-Cuns et al. (42)	NILM	CIN2+	100%	71.42%	20%	100%
	ASC-US		91.67%	51.61%	42.31%	94.12%
	LSIL		97.92%	34.46%	32.64%	9.08%
Wentzensen et al. (2015) (37)	NILM	CIN2+	70.7%	70.7%	13.1%	97.5%
		CIN3+	81.3%	69.6%	5.9%	99.4%

Tabela 8: Comparação entre a marcação dupla p16/Ki-67 e métodos de triagem em HPV positivas com citologia conhecida. Adaptado de (25,34,48,49)

Estudo	Comparação	Citologia	Lesão	Sensibilidade (p16/Ki-67 vs. teste de comparação)	Especificidade (p16/Ki-67 vs. teste de comparação)
Uijterwaal et al. (2015) (48)	HPV 16/18 (GP5+/6+)	NILM	CIN2+	68.8% vs. 43.8% (p=0.004)	72.8% vs. 79.4% (p=0.031)
			CIN3+	73.3% vs. 46.7% (p=0.125)	70.0% vs. 78.3% (p=0.005)
Wentzensen et al. (2012) (25,49)	HPV 16/18 (Linear Array)	ASC-US	CIN2+	81.8% vs. 42.4% (p=ne)	62.3% vs. 75.0% (p=ne)
			CIN3+	83.3% vs. 75.0% (p=ne)	55.1% vs. 75.8% (p=ne)
	HPV-HR (Linear Array)		CIN2+	81.8% vs. 97.0% (p=ne)	62.3% vs. 26.0% (p=ne)
			CIN3+	83.3% vs. 100% (p=ne)	55.1% vs. 22.4% (p=ne)
McMenamin et al. (34)	Cobas®4800 (HPV16/18)	ASC-US ou LSIL	CIN2+	87% vs. 49% (p=ne)	47% vs. 75% (p=ne)
			CIN3+	90% vs. 57% (p=ne)	42% vs. 72% (p=ne)

Em relação à genotipagem de HPV16/18 (tabela 8) o uso de p16/Ki-67 mostrou, em Uijterwaal et al. (2015), uma sensibilidade significativamente superior para CIN2+ e apenas superior para CIN3+, em mulheres com citologia normal. (48) Nos restantes, a sensibilidade foi superior em mulheres com citologia ASC-US e ASC-US ou LSIL. (25,34) A especificidade de p16/Ki-67 foi significativamente inferior na deteção de CIN3+ e CIN2+, em Uijterwaal et al. (2015) e inferior nos restantes estudos. (25,34,48) Em relação ao teste de HPV (tabela 8), mostrou sensibilidade inferior e especificidade superior na deteção CIN2+ e CIN3+, em Wentzensen et al. (2012). (25)

Uijterwaal et al. (2015), numa população HPV positiva com citologia normal, comparam a capacidade de deteção CIN2+ e CIN3+ (tabela 8), com um *follow-up* de 3 anos. O p16/Ki-67 conseguiu que mais de 70% das lesões CIN3+ fossem identificadas, com uma referenciação (35.8%) significativamente superior à genotipagem (28.0%). Registaram-se 4 casos de CIN3 no grupo p16/Ki-67 negativo, mas a maioria foi p16/Ki-67 positiva. Neste estudo, considerou-se a marcação dupla útil como teste de triagem. (48)

Considerando-se isoladamente resultados ASC-US/HPV-positivos em Wentzensen et al. (2012), numa população referenciada a colposcopia por ASC-US/HPV-positiva ou LSIL+, a marcação dupla mostrou uma taxa de referenciação para colposcopia de 48.20%, a genotipagem de HPV16/18 de 29.20% e o teste de HPV de 79.56%. Neste estudo, considera-se que poderia adiar-se a colposcopia nos casos negativos para p16/Ki-67 reavaliando-se, por exemplo, com teste de HPV ou marcação dupla após um ano. (25,49)

Em McMenamin et al., num *follow-up* de 2 anos em mulheres positivas para HPV com lesões minor (ASC-US ou LSIL), a positividade para HPV foi mais expressiva em mulheres com <25 anos, tal como para p16/Ki-67 que, no entanto, permitiria uma diminuição na referenciação de 40%, sendo também mais sensível e menos específica que a genotipagem de HPV16/18 para CIN2+ e CIN3+, em todos os grupos etários (<25 anos, <30 anos, e ≥30 anos). A sensibilidade foi particularmente elevada no grupo com <25 anos, tal como a percentagem de CIN2+ e CIN3+, com aumento do risco de CIN2+ caso se verifique um resultado positivo para p16/Ki-67. (34)

Em Ebisch et al., estudo já apresentado na subsecção 4.2.2, as estratégias de triagem com p16/Ki-67 que mostraram um aumento significativo na especificidade com sensibilidade semelhante à triagem de referência, na deteção de CIN3+, foram: a triagem com p16/Ki-67 de mulheres positivas para HPV-HR com citologia ASC-US ou LSIL e triagem com p16/Ki-67 de mulheres positivas para HPV-HR com citologia NILM, ASC-US ou LSIL, com 6 e 3 lesões CIN3 não detetadas, respetivamente. Para CIN2+, apenas a segunda estratégia mostrou esses resultados. A triagem de ASC-US ou LSIL com p16/Ki-67 diminuiu a referenciação de 64 para 53%. Confirmou-se, ainda, a possibilidade de alargar o diagnóstico de lesões de alto grau em mulheres positivas para HPV-HR com citologia normal, facto não isento de referenciações adicionais associadas. (47)

Em relação ao co-teste, segundo Wentzensen (2019), este poderá ser superado pela associação do teste primário de HPV com a marcação dupla, existindo alta sensibilidade e qualidade na deteção de lesões relevantes e menos colposcopias. Isto porque, o uso de p16/Ki-67 demonstrou um desempenho superior à citologia, com maior sensibilidade e

especificidade na triagem de mulheres positivas para HPV-HR, numa amostra submetidas a co-teste. (45)

#### 4.2.4 P16/Ki-67 como método reflexo de Citologia anormal e HPV desconhecido.

Apenas parte dos casos com citologia anormal apresentam lesão significativa: White et al., num *follow-up* de 2 anos, diagnosticaram CIN2+ subjacente em 29,3% das lesões LSIL e ASC-US e, em Possati-Resende et al., apenas 8,4% das mulheres com ASC-US e 22.1% das mulheres com LSIL apresentaram diagnóstico de CIN2/3. (24,28) Por outro lado, em Schmidt et al. houve casos ASC-US e LSIL, positivos para p16/Ki-67, com CIN1 e negativos para displasia na biopsia. (23)

Comparativamente aos marcador p16 isolado a marcação dupla p16/Ki-67 mostra especificidade superior na deteção de CIN2+ em mulheres com ASC-US e LSIL. (23,50)

Kisser & Zechmeister-Koss, numa revisão sistemática de 2015, concluíram que, com a evidência existente, não era possível recomendar o uso de p16/Ki-67 na triagem de lesões ASC-US e LSIL e que estudos adicionais eram necessários para avaliar a sua utilidade clínica. (51) No ano seguinte, numa meta-análise, a alta sensibilidade associada a moderada especificidade na deteção de lesões de alto grau e CCU, permitiu que fosse considerado como método auxiliar em citologia anormal. (19) Em 2019, numa meta-análise de Peeters et al., relata-se uma especificidade, para a marcação dupla, superior ao teste de HPV na deteção de lesões de alto grau, em especial em lesões LSIL. (50)

Estudos indicam que o uso de p16/Ki-67 pode identificar lesões CIN de alto grau com alta sensibilidade e especificidade em citologia ASC-US e LSIL. (16,23,26,52) A expressão de p16/Ki-67 mostrou-se superior em mulheres com <30 anos com: ASC-US e LSIL, ASC-US+ e ASC-US e LSIL de repetição. (21,24,52)

Para casos de LSIL, Costa no seu trabalho, apesar de descrever alta especificidade na triagem com marcação dupla ( $\geq 30$  anos: 92%;  $< 30$  anos: 100%), a sensibilidade ficou aquém do esperado [ $\geq 30$  anos: 50%;  $< 30$  anos: 0% (ausência de casos positivos)], não permitindo a sua indicação na triagem destas lesões. (12) Para a mesma lesão em mulheres com idade  $\geq 30$  anos, Ziemke et al. mostraram um aumento significativo na especificidade e VPP com o uso da marcação dupla, na deteção de CIN2+, considerando-se como possível método auxiliar da citologia. (38)

O teste de HPV pode ter lugar na triagem de ASC-US, ajudando a identificar as que precisam de referenciação. Contudo, em lesões de LSIL mostra baixa especificidade,

possivelmente pela elevada prevalência de infeções transitórias por HPV. (12,50) Na tabela 9 avalia-se a performance da marcação dupla versus teste de HPV, na triagem de mulheres com citologia anormal.

Tabela 9: Marcação dupla p16/Ki-67, testes de HPV e a sua relação em termos de especificidade e sensibilidade. Adaptado de (16,23,24,26–28,32,52). (p=ne: não especificado; vs.: versus)

Estudo	Teste de HPV	Lesão	População	Sensibilidade (p16/Ki-67 vs. teste de HPV)	Especificidade (p16/Ki-67 vs. teste de HPV)
Bergeron et al. (52)	HC2	CIN2+	ASC-US	94.4% vs. 100% (p=0.317)	78.7% vs. 60.4% (p<0.001)
			LSIL	85.7% vs. 98.4% (p=0.005)	53.3% vs. 15.6% (p<0.001)
Schmidt et al. (23)	HC2	CIN2+	ASC-US	92.2% vs. 90.9% (p=0.705)	80.6% vs. 36.6% (p<0.001)
			LSIL	94.2% vs. 96.4% (p=0.396)	68% vs. 19.1% (p<0.001)
Uijterwaal et al. (32)	HC2	CIN2+	ASC-US, LSIL e ASC-H	89.7% vs. 96.6% (p=0.219)	73.1% vs. 68.1% (p=0.08)
		CIN3+		100.0% vs. 96.3% (p=1.00)	64.4% vs. 57.6% (p=0.024)
White et al. (24)	HC2	CIN2+	ASC-US e LSIL de repetição	75.4% vs. 92.8% (p=ne)	88.3% vs. 48.9% (p=ne)
			ASC-US de repetição	71.9% vs. 94.7% (p=ne)	87.9% vs. 64.4% (p=ne)
			LSIL de repetição	77.8% vs. 91.4% (p=ne)	88.6% vs. 35.3% (p=ne)
Possati-Resende et al. (28)	Cobas® 4800	CIN2/3	ASC-US	62.5% vs. 87.5% (p=ne)	93.1% vs. 79.5% (p=ne)
			LSIL.	69.6% vs. 87.0% (p=ne)	75.3% vs. 34.7% (p=ne)
Zhang et al. (26)	Cobas® 4800	CIN2+	ASC-US e LSIL	89.01% vs. 95.6% (p=0.180)	66.67% vs. 3.70% (p<0.001)
Killeen et al. (27)	Cervista® HPV	CIN2/3	ASCUS+	94.3% vs. 91.4% (p=ns)	61.9% vs. 14.7% (p<0.001)
Waldstrøm et al. (16)	APTIMA® HPV	CIN2+	LSIL ( <i>follow-up</i> até 5 anos)	88.5% vs. 92.0% (p=ne)	51.3% vs. 36.1% (p=ne)
		CIN3+		95.7% vs. 95.7% (p=ne)	48.2% vs. 33.8% (p=ne)

A sensibilidade entre a marcação dupla e os diferentes teste de HPV foi maioritariamente semelhante, exceto em: White et al., Possati-Resende et al. e Waldstrøm

et al. para CIN2+ e Schmidt et al. em casos LSIL para CIN2+, onde foi inferior, e Bergeron et al. em casos LSIL, onde foi significativamente inferior (Tabela 9). (16,23,24,26–28,32,52) A inferior sensibilidade de p16/Ki-67 é justificada, por White et al., com a positividade superior do teste de HPV em CIN de alto grau e, por Possati-Resende et al., com os métodos utilizados e dificuldades de avaliação encontradas. (24,28)

A especificidade da marcação dupla foi superior, de forma significativa em Bergeron et al., Zhang et al. e Killeen et al. (Tabela 9). (16,23,24,26–28,32,52) Em Uijterwaal et al. a possível identificação excessiva de CIN2 prejudicou a especificidade, com diferenças significativas apenas para CIN3+. (32) Já Zhang et al., associam a baixa especificidade do teste de HPV ao baixo número de casos negativos na amostra. (26)

Os VPN e VPP de p16/Ki-67 sofrem uma maior variação entre os estudos. O VPP varia entre semelhante, superior, significativamente superior, inferior e significativamente inferior ao teste de HPV. (12,16,24,26,27,32) O VPN varia entre semelhante, superior e significativamente superior ao teste de HPV. (16,24,26,27,32)

Dois estudos incluem lesões de ASC-H. (27,32)

Em Schmidt et al., 34.9% de ASC-US e 52.5% de LSIL foram positivas para p16/Ki-67, tal como 44.1% das mulheres com citologia anormal (ASC-US/LSIL/ASC-H), em Uijterwaal et al., e 30.4% das lesões ASC-US e LSIL de repetição, em White et al. (23,24,32)

Neste último estudo, não existiu diferença significativa na prevalência de p16/Ki-67 entre ASC-US e LSIL, apesar de superior no último grupo, tal como em casos de LSIL em mulheres com <30 anos, ≥30 anos e no geral em Bergeron et al. (24,52) Da mesma forma, também em Possati-Resende et al. a positividade para p16/Ki-67 e teste de HPV foi superior em casos LSIL. (28) Comparando ambos os testes, a positividade para p16/Ki-67 em citologias ASC-US e LSIL mostra-se inferiores à positividade do teste de HPV, mesmo em casos de lesão de repetição e em mulheres com idade ≥30 anos e <30 anos. (16,24,52) No entanto, a prevalência de resultados positivos para p16/Ki-67 foi superior no grupo positivo para HPV em Uijterwaal et al (2014). (32)

Em White et al, a marcação dupla mostrou sensibilidade e especificidade comparáveis entre casos de ASC-US e LSIL de repetição, enquanto que para o teste de HPV estas foram significativamente superiores em casos ASC-US versus LSIL. Para ambos os testes, a sensibilidade é semelhante entre mulheres com <30 anos e ≥30 anos e a especificidade superior se idade ≥30 anos. Enquanto a diferença é modesta para p16/Ki-

67, o teste de HPV apresenta uma especificidade significativamente reduzida na faixa etária com <30 anos. De facto, o teste de HPV detetou uma proporção significativamente maior de CIN2+ e CIN3, mas, também, grande proporção de mulheres sem estas lesões, em relação à dupla marcação. (24)

Da mesma forma, em Possati-Resende et al., o teste de HPV foi superior na identificação de doentes com lesão significativa, mas com grande número de referências desnecessárias. Neste estudo, existe performance semelhante entre ambos os testes em mulheres com ASC-US, em especial com idade >30 anos, e em mulheres com LSIL e idade >30 anos. Contudo, em mulheres com idade ≤30 anos e LSIL a marcação dupla mostra uma especificidade superior ao teste de HPV, com performance superior. (28)

Waldstrøm et al., num *follow-up* mínimo de 5 anos, em citologias LSIL demonstrou um aumento da especificidade de p16/ki-67, face ao teste de HPV (mRNA), para CIN2+ e CIN3+, em especial nas mulheres com <30 anos. A especificidade de ambos os testes foi significativamente superior em mulheres com ≥30 anos na deteção de CIN3+, com diferença mais marcada para o teste de HPV. Não houve diferença significativa na sensibilidade entre os grupos etários. (16)

Schmidt et al. descreve um ganho adicional na especificidade de p16/Ki-67 em mulheres mais jovens com ASC-US, com o mesmo número de lesões detetadas com menos colposcopias, tal como Bergeron et al., com metade da referência destes casos em mulheres com <30 anos face ao teste HPV. (23,52) Um resultado positivo para p16/Ki-67 em citologias anormais leva a colposcopia. (26) Estudos indicam uma diminuição da referência para colposcopia comparativamente ao teste de HPV, que pode ocorrer de forma significativa (23,26,32). Killeen et al. descreve uma redução à volta dos 50% na referência para colposcopia com p16/Ki-67 em lesões ASC-US ou LSIL, em relação ao teste de HR-HPV, sem uma diminuição na deteção de CIN2/3. (27) Da mesma forma, para Bergeron et al. existe uma diminuição da referência, mantendo-se a identificação da maioria dos casos com necessidade de seguimento adicional. (52)

No caso de White et al., com lesões ASC-US e LSIL de repetição, um terço da população foi positiva para ambos os testes, com indicação para colposcopia imediata, mantendo-se a deteção de lesões de alto grau e a diminuição das colposcopias. Testes duplamente negativos permitem alto nível de segurança contra lesões CIN3, semelhante a um teste de HPV negativo. Em casos discordantes (HPV-positivas, mas p16/Ki-67 negativas), pelo risco de lesão de alto grau, considera-se mais adequado um seguimento posterior ou uma possível referência para colposcopia. Neste estudo, considera-se que

uma abordagem combinada (teste de HPV associado a p16/Ki-67) permitirá manter a alta sensibilidade do teste de HPV e melhorar a especificidade existente com o uso de p16/Ki-67. (24)

Com genotipagem alargada, em mulheres com ASC-US e LSIL, Fujii et al. observaram sensibilidade semelhante ao uso de p16/Ki-67, que apresentava especificidade estatisticamente superior à genotipagem, tendo sido considerado mais exato na deteção de CIN2+ em todas as faixas etárias. (53)

### **4.3 P16/Ki-67 e relação com a Genotipagem.**

A genotipagem pode ser parcial, com identificação dos tipos 16 e 18, ou alargada, com informações de genótipos individuais para além dos tipos 16 e 18, por norma referidos como “12-HPV-HR”. (20) As infeções por múltiplos genótipos podem verificar-se e foram registadas em 3,5% dos casos em Singh et al. (12,54)

O tipo 16 é o mais prevalente, responsável em Stoler et al. por 48,5% dos casos CIN3+, comparativamente, neste estudo o HPV18 apresentou um risco de cerca de metade face ao HPV16, apesar de representar apenas 10% dos casos. (1,20,54)

Estudos mostram que, face a outros tipos de HPV-HR, existe uma forte relação entre a expressão de p16/Ki-67 e a infeção por HPV16 e/ou 18, associada ao seu particular potencial carcinogénico, e maior frequência de genótipos de alto risco em casos positivos para p16/Ki-67. (29,34,44) Wentzensen et al. (2012) relataram, no geral, uma positividade para p16/Ki-67 superior à genotipagem de HPV16/18. (25)

Neste último estudo, a sensibilidade de 100% da dupla marcação, na deteção de lesões no subgrupo de CIN3 onde a invasão é mais provável (mulheres com  $\geq 30$  anos e HPV16 presente), sugere que um resultado negativo para p16/Ki-67 permite um atraso seguro da referenciação para colposcopia. (25) Em McMenamin et al. o risco em mulheres com citologia minor, positivas para HPV16/18, ultrapassou o limite para colposcopia imediata em todos os grupos etários. Contudo, se idade  $< 25$  anos e positivas para genótipo não-16/18 o risco foi mais baixo, com potencial benefício de p16/Ki-67 com uma redução nas colposcopias de 31%. (34)

Stoler et al. avaliaram a performance de diferentes estratégias de triagem em mulheres HPV-HR positivas, que incluíam genotipagem alargada ou p16/Ki-67 com ou sem genotipagem parcial. No algoritmo de referência é utilizada a citologia para triar

mulheres positivas para HPV-HR não-16/18, enquanto se encaminha positivas para HPV16/18 diretamente para colposcopia (Tabela 10). (20)

A realização de p16/Ki-67 em casos positivos para HPV-HR não-16/18, combinado com a genotipagem HPV16/18, aumenta a sensibilidade com aumento da referência para colposcopia, mas em proporção inferior. O uso dos genótipos 16/18 apenas para triagem, sem encaminhamento de outros tipos de HPV-HR para a colposcopia, diminuiu o número de colposcopias, mas também a deteção de CIN3+ (Tabela 10). (20)

O uso de p16/Ki-67 em todas as mulheres HPV-HR positivas foi também superior ao algoritmo de referência, com redução na proporção e número de colposcopias. Verificou-se perda de sensibilidade, contudo esta não foi significativa (Tabela 10). (20)

Tabela 10: Comparação de vários métodos de triagem com genotipagem e p16/Ki-67. (12-HPV-HR+: positivo para tipo não 16/18; S: sensibilidade; E: Especificidade). Adaptado de Stoler et al. (20)

Método de triagem de HPV positivas (indicação para colposcopia)	S	E	CIN3+	Proporção colposcopia/CIN3+
12-HPV-HR+ com Citologia anormal Ou HPV16/18+ (Referência)	77.19%	61.62%	77,2%	7,3
12-HPV-HR+ com p16/Ki-67 positivo Ou HPV16/18+	85.96%	60.10%	86,0%	6,9
HPV-HR+ com p16/Ki-67+	73.68%	76.29%	73,7%	5,1
HPV16/18+	59.06%	76.52%	59,1%	6,0

Neste estudo, considera-se que a necessidade de citologia positiva, para triar tipos não-16/18, revela as suas limitações nesses genótipos. A substituição por p16/Ki-67 permitiu melhorar a taxa de deteção de lesões na colposcopia e a associação da dupla marcação com a genotipagem parcial pode potenciar a redução na proporção de colposcopias. Em relação às estratégias alargadas de genotipagem, estas podem evitar custos adicionais e identificar um número comparável de casos, mas à custa de maiores proporções de colposcopia. (20)

Deste modo, em Stoler et al. a única estratégia com maior sensibilidade sem perda de especificidade foi: “HPV16/18+ ou 12 outros HR-HPV+ com p16/Ki-67+”. (20)

Para Stoler et al., em relação ao rastreio e ao impacto da vacinação, estratégias que incorporam a marcação dupla, com informações de risco independente de genótipo e que reflete risco de neoplasia, ou estratégias que permitem identificar genótipos individuais poderão ter maior interesse. Contudo, também se considera que estratégias baseadas

apenas em genotipagem não se apresentam como superiores, já que se baseiam apenas no risco sem avaliar as alterações celulares, com potenciais atrasos no diagnóstico no caso de negativas para HPV16/18. (20)

#### **4.4. P16/Ki-67 na avaliação do risco oncológico.**

Em mulheres HPV positivas, num contexto de rastreio primário de HPV, a estratégia de genotipagem parcial associada a marcação dupla p16/Ki-67, comparativamente à associação de genotipagem parcial com citologia, ofereceu melhor estratificação do risco para CIN3+ e significativamente menos encaminhamento para colposcopia imediata, em Wentzensen et al. (2019). Neste estudo, no caso de positividade para HPV 16/18, a existência de uma citologia NILM mostrava um risco que implicava referenciação para colposcopia, enquanto um resultado negativo para p16/Ki-67 mostrava um risco elevado, mas não o suficiente para referenciação. Resultados duplamente negativos (HPV16/18 e p16/Ki-67) ofereciam o menor risco. Na verdade, a associação de p16/Ki-67 com genotipagem parcial obteve um número de mulheres com indicação para colposcopia semelhante ao uso de p16/Ki-67 isolado, que também ofereceu boa estratificação do risco, com 50% das mulheres sem indicação para referenciação (p16/Ki-67 negativas) e 50% com colposcopia imediata (p16/Ki-67 positivas). Também em mulheres HPV positivas, mas negativas para HPV16/18, o uso de p16/Ki-67 mostrou estratificação do risco superior à citologia. (45)

Na triagem de mulheres HPV-positivas com  $\geq 30$  anos submetidas a co-teste, Clarke et al. em SurePath®, encontrou melhor estratificação do risco a longo prazo para CIN2+/3+ com p16/Ki-67 versus com citologia, num *follow-up* de 5 anos. Se existir um resultado positivo para p16/Ki-67 o risco cumulativo para CIN2+ é significativamente superior a uma citologia anormal (ASC-US+). Se o resultado for negativo, é significativamente inferior ao de uma citologia normal (NILM). Deste modo, a associação de um teste de HPV positivo com um teste p16/Ki-67 negativo apresentava um risco a 3 anos idêntico ao risco a 1 ano da associação de teste de HPV positivo com uma citologia NILM. Deste modo, mulheres positivas para HPV, cujo resultado para p16/Ki-67 seja negativo, podem não ter referenciação imediata para colposcopia, com possível alargamento do intervalo de seguimento e repetição do teste após 3 anos. (55) Wentzensen et al. (2015) numa população semelhante, mas num *follow-up* de 2 anos, registou para mulheres HPV e p16/Ki-67 positivas, um risco de CIN2+/3+ acima do estabelecido para colposcopia, enquanto um resultado negativo para p16/Ki-67, apresentava um risco inferior ao estabelecido para retorno em um ano. Assim sendo, mulheres positivas para p16/Ki-67 seriam referenciadas a colposcopia e as negativas repetiriam teste até 2 anos. O

mesmo ocorreu no caso de mulheres positivas para HPV com citologia NILM, abrindo-se a possibilidade de utilização do p16/Ki-67 na sua triagem. (37)

Nesta última população (HPV positiva com citologia NILM), Uijterwaal et al. (2015) avaliaram o risco cumulativo a 5 anos, de CIN3+ e CIN2+, e observaram um risco significativamente inferior caso se verifique um resultado negativo para p16/Ki-67, contudo, sem diferença significativa face a uma genotipagem de HPV16/18 negativa. (48)

Numa população referenciada a colposcopia por ASC-US/HPV-positivo ou LSIL+, Wentzensen et al. (2012) encontrou boa estratificação do risco, com risco de CIN3+ superior em mulheres p16/Ki-67 positivas com idade  $\geq 30$  anos. (25) Também, Uijterwaal et al. (2014), em casos de citologia anormal (ASC-US/ASC-H/LSIL), em amostras convencionais e em comparação com teste de HPV na deteção de CIN2+ e CIN3+, registou o maior risco a 5 anos em mulheres positivas para teste de HPV e p16/Ki-67 e o menor em negativas para ambos. Contudo, e apesar de não significativo, para CIN2+, o risco a 5 anos com um teste de HPV negativo era inferior a um teste p16/Ki-67 negativo. Deste modo, aconselham em mulheres com citologia anormal, negativas para p16/Ki-67, um seguimento dentro de 2 anos. (32) No caso de citologia ASC-US, uma meta-análise de 2019 encontrou que, caso o teste de HPV fosse negativo, o risco permitia o regresso ao rastreio enquanto um resultado p16/Ki-67 negativo ficava acima desse limiar. Se fossem positivos, existia indicação para referenciação para colposcopia. Em contraste, para casos LSIL, um teste de HPV negativo não permitia o regresso ao rastreio e o uso de p16/Ki-67 foi mais eficiente na sua triagem: se negativo permitia o regresso ao rastreio e se positivo existia indicação para colposcopia. (50)

Transitando agora para um cenário pós-colposcopia normal, Solares et al. avaliaram o risco, comparando-o com os resultados da citologia e do teste de HPV, em citologias NILM/HPV-positivas, ASC-US e LSIL e observaram que a positividade para p16/Ki-67 seria capaz de predizer o risco de CIN2+ (inclui adenocarcinoma *in situ*) durante um período de 1 ano. Após colposcopia normal, se existisse expressão persistente de p16/Ki-67, o risco de desenvolver uma lesão de alto grau foi de 23% (uma em cada cinco mulheres desenvolveu CIN2+). No entanto, estes dados são limitados pelo baixo número de mulheres nestas condições. Contrariamente, as negativas para p16/Ki-67, após colposcopia normal, registaram baixo risco de CIN2+. (56)

Em mulheres sujeitas a tratamento (LEEP), após um ano da sua realização todas foram negativas para p16/Ki-67, com ausência de recorrência de lesão na colposcopia de controlo, independentemente do resultado do teste de HPV, apesar do pequeno número

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

de casos avaliado. Considera-se, assim, uma potencial ferramenta na avaliação de recorrência após tratamento. (56)

#### 4.5. Avaliação dos Custos.

O uso da marcação dupla p16/Ki-67 tem um custo associado, tal como a colposcopia. (17) Custo que deve ser comparado com a diminuição do número de colposcopias, bem como o desconforto, biopsias desnecessárias e tempo associado às mesmas. (17,24,25)

Tabela 11: Dados belgas que permitem perceber os custos associados ao rastreio e diagnóstico. Adaptado de Tjalma et al. (57)

Procedimento	Custo
<b>Rastreio</b>	
Visita médica	28,05€
Citologia	23,41€ (laboratório) +23,41€ (profissional)
Teste de HPV-DNA	35,00€
CINtec®PLUS	60,00€
<b>Diagnóstico</b>	
Visita médica	28,05€,
colposcopia com biopsia	108,1€

Estudos indicam que o uso de p16/Ki-67 pode permitir uma diminuição dos custos, em comparação com a citologia e em casos em que é utilizado na triagem de mulheres HPV positivas num rastreio primário de HPV. (37,57)

Nesta linha, Killeen et al. compararam a realização de p16/Ki-67 com o teste de HPV, na triagem de citologias anormais, e concluíram que a sensibilidade semelhante associada ao aumento da especificidade poderia diminuir visitas médicas e procedimentos com poupanças significativas na população, potencialmente extrapoláveis para utilização em larga escala, mantendo-se a deteção de lesões significativas. As poupanças calculadas não incluem o benefício, para a doente, da diminuição no stress associado a procedimentos adicionais. Tal poupança verificou-se no caso de citologias: ASC-US, LSIL e ASC-H. (27)

## 4.6. Situações particulares.

### 4.6.1. Alterações Glandulares.

Nestes casos, a marcação dupla p16/Ki-67 poderá ter lugar num contexto de rastreio primário ou após um teste de HPV positivo. (43)

O seu diagnóstico pode ser difícil: as alterações reativas assemelham-se às alterações neoplásicas e a sua baixa frequência leva ao sobre diagnóstico, e consequente referenciação para colposcopia, para diminuir a probabilidade de não serem detetadas. São evidentes em ampliações mais baixas e os critérios de interpretação diferem das alterações pavimentosas, mantendo-se a avaliação morfológica mesmo com a realização de p16/Ki-67, nomeadamente aglomerados de células duplamente marcadas, por norma ausentes em alterações reativas. (43)

Em McMenamin et al., todos os adenocarcinomas *in situ* foram positivos para p16/Ki-67, em Wentzensen et al houve uma positividade de 88,4% em mulheres com CIN3 ou adenocarcinoma *in situ*. (34,45)

Em Singh et al., houve expressão de p16/Ki-67 em todas as lesões glandulares da mucosa endometrial. Foi o teste mais específico para deteção de CIN2+ subjacente (CIN2, CIN3, AIS ou adenocarcinoma), em contraste com o teste de HPV (Multiplex PCR) onde a inclusão de lesões glandulares endometriais diminuiu a sensibilidade, refletindo a limitada relação com a infeção por HPV-HR. Assim, o p16/ki-67 permitiu obter uma alta sensibilidade e especificidade superior no diagnóstico de lesões pavimentosas e glandulares de alto grau, relativamente à citologia ou teste de HPV-HR isolados. (54)

Ravarino et al. avaliaram e mostraram a utilidade da marcação dupla p16/Ki-67 no diagnóstico de lesões glandulares, com possível diminuição de falsos negativos ou resultados *borderline* e uma diferença significativa na expressão de p16/Ki-67 entre os casos com *follow-up* negativo e positivo. A reatividade do epitélio foi evidente em amostras mais recentes, com alta celularidade. Como uma alta celularidade é comum nesta neoplasia, a avaliação em amostras de rotina recentes será, à partida, mais fácil, face a amostras mais antigas onde uma intensidade inferior de p16 foi mais frequente. (43)

### 4.6.2. Infeção por *Chlamydia trachomatis*.

A *Chlamydia trachomatis* (CT), um microrganismo intracelular, pode causar infeção assintomática e sequelas graves. Está associada a hipertrofia e metaplasia. (58)

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

A coinfeção com HPV em lesões cervicais e a sua relação com a expressão de p16 e Ki-67 foi avaliada, por Calil et al., em imunohistoquímica. Apesar de se ter observado que mais de metade das doentes eram positivas para p16 e mais de um terço para ambos os marcadores, não houve associação entre a existência de lesão histológica e a coinfeção, nem associação da infeção por CT com a carcinogénese. (58)

Em imunocitoquímica, Robial et al, avaliaram a associação da infeção por CT e infeção por HPV persistente, usando p16/Ki-67 em vez do teste de HPV. Registou-se maior prevalência de CT em lesões CIN<sub>1</sub>, mas os resultados não foram significativos. Não se registou associação entre a presença de CT e anormalidades citológicas ou entre a presença de CT e a positividade para p16/Ki-67 em mulheres com citologia anormal. (59)

## Capítulo 5: Conclusão.

O rastreio do CCU tem um impacto relevante na morbimortalidades por CCU e continua atualmente a ser alvo de desenvolvimento de novas técnicas de rastreio.

Face à informação apresentada, devemos ter em atenção que as amostras, recursos e designs dos estudos, não são fixos e sofrem variabilidade, que naturalmente se refletem na variação dos resultados.

A marcação dupla p16/Ki-67 apresenta-se como uma técnica de fácil execução e treino rápido, independente da morfologia e reprodutível mesmo em grande escala. Contudo, não está isento de limitações, de falsos positivos ou falsos negativos. Estas limitações podem ser minimizadas, pela utilização de amostras recentes e com material residual suficiente após realização de testes adicionais. A interpretação poderá ser facilitada pelo uso de amostras Thinprep®, de acordo com as indicações, mas não se exclui o uso em SurePath®. A automatização total do método pode colmatar as limitações de interpretação manual e permitir a realização conjunta com citologia pelo método de Papanicolaou.

Uma vantagem da dupla marcação é a possível utilidade em contextos de baixos recursos. Apesar de não indicado, é possível a realização por pessoal não especializado após um curto período de treino. Contudo, economicamente poderão existir condicionamentos. É, portanto, uma vertente que necessita de avaliação adicional.

Não há informação suficiente para confirmar a utilidade da marcação dupla p16/Ki-67 como teste primário, apesar de alta sensibilidade e especificidade apresentadas em alguns contextos e a possibilidade de compensar a baixa sensibilidade da citologia e baixa especificidade dos testes de HPV. Contudo, poderá ter um papel auxiliar, abrindo-se a hipótese da sua associação com o teste primário de HPV substituir o co-teste. Na verdade, as indicações aprovadas em março de 2020, não apontam para o seu uso enquanto teste primário.

As indicações apontam, sim, para o uso no rastreio primário de HPV e no rastreio com citologia cervical e teste de HPV-HR. De facto, na triagem de mulheres HPV-positivas, possui melhor concordância com a histologia que a citologia, com possível evicção da referenciação em p16/Ki-67 negativas. Na relação com genotipagem de HPV16/18, abordagens sequenciais ou combinadas foram promissoras, nomeadamente as que combinam a genotipagem com p16/Ki-67, permitindo menos falsos negativos em

relação ao uso isolado e menos referências em relação à combinação citologia/genotipagem. A estratificação do risco foi também superior sem necessidade de referência em HPV16/18-positivas/p16/Ki-67-negativas e possível alargamento do intervalo de rastreio, que varia entre autores. Da mesma forma, em caso de citologia NILM/HPV-positivas, mostrou alta sensibilidade para lesões de alto grau mesmo em comparação com a genotipagem. Pontos que vão de acordo com o indicado.

Para além dos cenários anteriores, também em casos HPV positivos com citologia anormal permitiria diminuir a referência, particularmente em mulheres mais jovens, onde a percentagem de HPV positivas é superior. Aqui, uma abordagem combinada (marcação dupla p16/Ki-67 com a genotipagem de HPV16/18) poderia ser alvo de avaliação, já que o p16/Ki-67 parece ser superior em termos de sensibilidade e a genotipagem de especificidade. A performance também parece ser positiva em mulheres onde apenas é conhecida citologia anormal, em especial em lesões LSIL e mulheres com <30 anos, onde o teste de HPV revela as suas maiores limitações. Abrindo-se a possibilidade de ser superior à genotipagem alargada em mulheres com citologia anormal. Também aqui uma abordagem combinada permitiria manter a alta sensibilidade do teste de HPV e compensar a sua baixa especificidade com o uso de p16/Ki-67. O potencial em lesões ASC-H carece de mais investigação.

Em cenários pós-referência, poderá ter lugar na monitorização do risco de lesão, posterior a colposcopia normal ou em casos pós-LEEP. Para já, carece de exploração adicional e o ideal será o seguimento em co-teste com teste de HPV.

Em populações vacinadas a marcação dupla p16/Ki-67 oferece uma avaliação independente de genótipo e com indicação de infeção persistente, importante quando se prevê que a epidemiologia dos genótipos sofra alterações. Na triagem de mulheres negativas para HPV16/18 mostra-se útil, nomeadamente, em relação a estratégias de genotipagem alargada que podem gerar, comparativamente, mais colposcopias e à triagem com citologia, cuja performance poderá diminuir.

Em lesões não pavimentosas, é positiva a capacidade que existe de auxiliar no diagnóstico de lesões glandulares, que podem apresentar-se numa citologia de rotina.

A infeção por CT pode ocorrer em associação com a infeção por HPV e a sua relação com a expressão de p16/Ki-67 deve ser alvo de exploração.

Para o futuro, a marcação dupla p16/Ki-67 poderá ter interesse na triagem de mulheres HPV positiva sem alterações na citologia ou com alterações minor (ASC-US e

LSIL). Contudo, a relação custo-benefício deveria ser avaliada tendo em conta a nossa realidade nacional, com vista à sua inclusão no programa nacional de rastreio do cancro do colo do útero, permitindo delinear algoritmos de execução e seguimento adequados. Teria também interesse no futuro uma exploração mais aprofundada, da sua utilidade em contextos de vacinação e de auto-colheita, tendo em conta as novas realidades.

Para já os resultados são favoráveis, apoiando a implementação não como primeira linha, mas como adjuvante e/ou em estratégias combinadas.

O papel da marcação dupla p16INK4a/Ki-67 no rastreio do cancro do colo do útero.

## Capítulo 6: Bibliografia.

1. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal MAP. MEDICAL MICROBIOLOGY. 8th Editio. Elsevier, editor. Vol. 53. Elsevier; 2013. 1689–1699 p.
2. Moutinho J. Human papillomavirus e lesões intra-epiteliais do tracto genital inferior. In: Oliveira CF de, editor. Manual de Ginecologia. Lisboa: Permanyer; 2011. p. 215–24.
3. José Cardoso Moutinho. Cancro Do Colo Uterino e Vagina. In: Oliveira CF de, editor. Manual de Ginecologia. Lisboa: Permanyer; 2009. p. 353–64.
4. Gupta N, Srinivasan R, Rajwanshi A. Functional biomarkers in cervical precancer: An overview. Selvaggi S, editor. Diagn Cytopathol. 2009;36(4):NA-NA.
5. Ginecologia SP de. Consenso sobre infecção por HPV e neoplasia intraepitelial do colo vulva e vagina. Consensos Nacionais 2014. 2014.
6. Bergeron C, von Knebel Doeberitz M. The Role of Cytology in the 21st Century: The Integration of Cells and Molecules. Acta Cytol. 2016;60(6):540–2.
7. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. Int J Cancer. 2019 Apr 15;144(8):1941–53.
8. Curry SJ, Krist AH, Owens DK, Barry MJ, Caughey AB, Davidson KW, et al. Screening for Cervical Cancer. JAMA. 2018 Aug 21;320(7):674.
9. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri. Int J Gynecol Obstet. 2018 Oct;143:22–36.
10. Miranda N, Gonçalves MB. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas 2017. Direção-Geral da Saúde. 2017.
11. Safaeian M, Sherman ME. From Papanicolaou to Papillomaviruses: Evolving Challenges in Cervical Cancer Screening in the Era of Human Papillomavirus Vaccination. JNCI J Natl Cancer Inst. 2013 Oct 16;105(20):1524–6.
12. Costa MC da. CINTec ® PLUS ( Ki-67 e p16 INK4a ) vs Métodos Biomoleculares em casos de Lesão Intraepitelial Baixo Grau do colo do útero. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2013.
13. Yu LL, Guo HQ, Lei XQ, Qin Y, Wu ZN, Kang LN, et al. p16/Ki-67 co-expression associates high risk human papillomavirus persistence and cervical histopathology: A 3-year cohort study in China. Oncotarget. 2016;7(40):64810–9.
14. Cuschieri K, Ronco G, Lorincz A, Smith L, Ogilvie G, Mirabello L, et al. Eurogin roadmap 2017: Triage strategies for the management of HPV-positive women in cervical screening programs. Int J Cancer. 2018;143(4):735–45.
15. Nayar R, Wilbur DC, editors. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology.

- Third Edit. Cham: Springer International Publishing; 2015. 1–321 p.
16. Waldstrøm M, Christensen RK, Ørnkov D. Evaluation of p16 INK4a /Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Cytopathol.* 2013 Mar;121(3):136–45.
  17. Edgerton N, Cohen C, Siddiqui MT. Evaluation of CINtec PLUS® testing as an adjunctive test in ASC-US diagnosed SurePath® preparations. Vol. 41, *Diagnostic Cytopathology.* 2013. p. 35–40.
  18. Polman NJ, Uijterwaal MH, Witte BI, Berkhof J, van Kemenade FJ, Spruijt JWM, et al. Good performance of p16/ki-67 dual-stained cytology for surveillance of women treated for high-grade CIN. *Int J Cancer.* 2017;140(2):423–30.
  19. Chen C-C, Huang L-W, Bai C-H, Lee C-C. Predictive value of p16/Ki-67 immunocytochemistry for triage of women with abnormal Papanicolaou test in cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis. *Ann Saudi Med.* 2016 Jul;36(4):245–51.
  20. Stoler MH, Baker E, Boyle S, Aslam S, Ridder R, Huh WK, et al. Approaches to triage optimization in HPV primary screening: Extended genotyping and p16/Ki-67 dual-stained cytology—Retrospective insights from ATHENA. *Int J Cancer.* 2020 May 6;146(9):2599–607.
  21. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(20):1550–7.
  22. Ngugi CW, Schmidt D, Wanyoro K, Boga H, Wanzala P, Muigai A, et al. P16INK4a/Ki-67 dual stain cytology for cervical cancer screening in Thika district, Kenya. *Infect Agent Cancer.* 2015;10(1):2–7.
  23. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. P16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathol.* 2011;119(3):158–66.
  24. White C, Bakhiet S, Bates M, Keegan H, Pilkington L, Ruttle C, et al. Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. *Cytopathology.* 2016 Aug;27(4):269–76.
  25. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 Immunostaining to Detect Cervical Cancer Precursors in a Colposcopy Referral Population. *Clin Cancer Res.* 2012 Aug 1;18(15):4154–62.
  26. Zhang R, Ge X, You K, Guo Y, Guo H, Wang Y, et al. p16/Ki67 dual staining improves the detection specificity of high-grade cervical lesions. *J Obstet Gynaecol Res.* 2018 Nov;44(11):2077–84.

27. Killeen JL, Dye T, Grace C, Hiraoka M. Improved abnormal pap smear triage using cervical cancer biomarkers. *J Low Genit Tract Dis.* 2014;18(1):1–7.
28. Possati-Resende JC, Fregnani JHTG, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *Gree M, editor. PLoS One.* 2015 Jul 31;10(7):e0134445.
29. Prigenzi KCK, Heinke T, Salim RC, Focchi GR de A. Dual p16 and Ki-67 Expression in Liquid-Based Cervical Cytological Samples Compared to Pap Cytology Findings, Biopsies, and HPV Testing in Cervical Cancer Screening: A Diagnostic Accuracy Study. *Acta Cytol.* 2018;62(2):104–14.
30. CINtec® PLUS E-learning [Internet]. [cited 2020 Feb 3]. Available from: <http://reagent-catalog.roche.com/static/CINtecPLUSCytology/>
31. SUMMARY OF SAFETY AND EFFECTIVENESS DATA (SSED) [Internet]. [cited 2020 Apr 30]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf19/P190024B.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf19/P190024B.pdf)
32. Uijterwaal MH, Witte BI, Van Kemenade FJ, Rijkaart D, Ridder R, Berkhof J, et al. Triage of borderline/mild dyskaryotic Pap cytology with p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: cross-sectional and longitudinal outcome study. *Br J Cancer.* 2014;110(6):1579–86.
33. Ovestad IT, Dalen I, Hansen E, Loge JLD, Dybdahl BM, Dirdal MB, et al. Clinical value of fully automated p16/Ki-67 dual staining in the triage of HPV-positive women in the Norwegian Cervical Cancer Screening Program. *Cancer Cytopathol.* 2017;125(4):283–91.
34. McMenamin M, McKenna M, McDowell A. Clinical utility of CINTEC plus triage in equivocal cervical cytology and human papillomavirus primary screening. *Am J Clin Pathol.* 2018;150(6):512–21.
35. Wentzensen N, Fetterman B, Tokugawa D, Schiffman M, Castle PE, Wood SN, et al. Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki-67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. *Cancer Cytopathol.* 2014;122(12):914–20.
36. Allia E, Ronco G, Coccia A, Luparia P, MacRì L, Fiorito C, et al. Interpretation of p16INK4a/Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive women by experts and nonexperts in cervical cytology. Vol. 123, *Cancer Cytopathology.* 2015. p. 212–8.
37. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, et al. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(12):djv257.
38. Ziemke P, Marquardt K, Griesser H. Predictive Value of the Combined p16 INK4a

- and Ki-67 Immunocytochemistry in Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions. *Acta Cytol.* 2014;58(5):489–94.
39. Gertych A, Joseph AO, Walts AE, Bose S. Automated Detection of Dual p16/Ki67 Nuclear Immunoreactivity in Liquid-Based Pap Tests for Improved Cervical Cancer Risk Stratification. *Ann Biomed Eng.* 2012 May 4;40(5):1192–204.
  40. Benevolo M, Allia E, Gustinucci D, Rollo F, Bulletti S, Cesarini E, et al. Interobserver reproducibility of cytologic p16 INK4a /Ki-67 dual immunostaining in human papillomavirus-positive women. *Cancer Cytopathol.* 2017 Mar;125(3):212–20.
  41. McMenamin M, McKenna M, McDowell A, Dawson C, McKenna R. Intra- and inter-observer reproducibility of CINtec ® PLUS in ThinPrep ® cytology preparations. *Cytopathology.* 2017 Aug;28(4):284–90.
  42. Areán-Cuns C, Mercado-Gutiérrez M, Paniello-Alastruey I, Mallor-Giménez F, Córdoba-Iturriagoitia A, Lozano-Escario M, et al. Dual staining for p16/Ki67 is a more specific test than cytology for triage of HPV-positive women. *Virchows Arch.* 2018 Nov 9;473(5):599–606.
  43. Ravarino A, Nemolato S, Macciocu E, Frascini M, Senes G, Faa G, et al. CINtec PLUS Immunocytochemistry as a Tool for the Cytologic Diagnosis of Glandular Lesions of the Cervix Uteri. *Am J Clin Pathol.* 2012 Nov 1;138(5):652–6.
  44. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2012 Aug;126(2):198–202.
  45. Wentzensen N, Clarke MA, Bremer R, Poitras N, Tokugawa D, Goldhoff PE, et al. Clinical Evaluation of Human Papillomavirus Screening with p16/Ki-67 Dual Stain Triage in a Large Organized Cervical Cancer Screening Program. *JAMA Intern Med.* 2019;179(7):881–8.
  46. Stanczuk GA, Baxter GJ, Currie H, Forson W, Lawrence JR, Cuschieri K, et al. Defining Optimal Triage Strategies for hrHPV Screen-Positive Women—An Evaluation of HPV 16/18 Genotyping, Cytology, and p16/Ki-67 Cytoimmunochemistry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017 Nov;26(11):1629–35.
  47. Ebisch RMF, Van Der Horst J, Hermsen M, Lucia Rijstenberg L, Vedder JE, Bulten J, et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology as triage test for high-risk human papillomavirus-positive women. *Mod Pathol.* 2017;30(7):1021–31.
  48. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, van Kemenade FJ, Rijkaart D, Berkhof J, et al. Triage HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained

- cytology testing: Baseline and longitudinal data. *Int J Cancer*. 2015 May 15;136(10):2361–8.
49. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 Immunostaining to Detect Cervical Cancer Precursors in a Colposcopy Referral Population. *Clin Cancer Res*. 2012 Aug 1;18(15):Supplementary table 2.
  50. Peeters E, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. Meta-analysis of the accuracy of p16 or p16/Ki-67 immunocytochemistry versus HPV testing for the detection of CIN2+/CIN3+ in triage of women with minor abnormal cytology. *Cancer Cytopathol*. 2019 Mar 27;127(3):169–80.
  51. Kissler A, Zechmeister-Koss I. A systematic review of p16/Ki-67 immuno-testing for triage of low grade cervical cytology. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2015;122(1):64–70.
  52. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol*. 2015;123(6):373–81.
  53. Fujii T, Saito M, Hasegawa T, Iwata T, Kuramoto H, Kubushiro K, et al. Performance of p16INK4a/Ki-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. *Int J Clin Oncol*. 2015 Feb 18;20(1):134–42.
  54. Singh M, Mockler D, Akalin A, Burke S, Shroyer AL, Shroyer KR. Immunocytochemical colocalization of P16INK4a and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma pilot studies. Vol. 120, *Cancer Cytopathology*. 2012. p. 26–34.
  55. Clarke MA, Cheung LC, Castle PE, Schiffman M, Tokugawa D, Poitras N, et al. Five-Year Risk of Cervical Precancer Following p16/Ki-67 Dual-Stain Triage of HPV-Positive Women. *JAMA Oncol*. 2019 Feb 1;5(2):181.
  56. Solares C, Velasco J, Álvarez-Ruiz E, González-Fernández L, Encinas AI, Astudillo A, et al. Expression of p16/Ki-67 in ASC-US/LSIL or normal cytology with presence of oncogenic HPV DNA. *Anticancer Res*. 2015;35(11):6291–5.
  57. Tjalma WAA, Kim E, Vandeweyer K. The impact on women's health and the cervical cancer screening budget of primary HPV screening with dual-stain cytology triage in Belgium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017 May;212:171–81.
  58. Calil LN, Igansi CN, Meurer L, Edelweiss MIA, Bozzetti MC. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus coinfection: Association with p16INK4a and Ki67 expression in biopsies of patients with preneoplastic and neoplastic lesions.

Brazilian J Infect Dis. 2011;15(2):126–31.

59. Robial R, Longatto-Filho A, Roteli-Martins CM, Silveira MF, Stauffert D, Ribeiro GG, et al. Frequency of Chlamydia trachomatis infection in cervical intraepithelial lesions and the status of cytological p16/Ki-67 dual-staining. Infect Agent Cancer. 2017;12(1):1–7.