

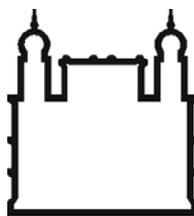
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

**O IMPACTO DA MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA p16 E Ki-67 NA
REPRODUTIBILIDADE DIAGNÓSTICA DAS BIÓPSIAS DO COLO UTERINO**

Viviane Rodrigues da Silva

Rio de Janeiro

Março de 2017



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

**O IMPACTO DA MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA p16 E Ki-67 NA
REPRODUTIBILIDADE DIAGNÓSTICA DAS BIÓPSIAS DO COLO UTERINO**

Viviane Rodrigues da Silva

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

Orientadora: Dr. Cecília Vianna de Andrade

Rio de Janeiro

Março de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Viviane Rodrigues da .

O impacto da marcação imuno-histoquímica para p16 e Ki-67 na reprodutibilidade diagnóstica das biópsias do colo uterino / Viviane Rodrigues da Silva. - Rio de Janeiro, 2017.

87 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2017.

Orientadora: Cecília Vianna de Andrade.

Bibliografia: f. 78-82

1. neoplasia intraepitelial cervical. 2. p16. 3. Ki-67. 4. colo uterino. 5. imuno-histoquímica. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca da Saúde da Mulher e Criança/ICICT/IFF com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A minha mãe, Maria R, pelo apoio e incentivo naqueles idos de maio que foi o começo desta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me permitido superar os desafios e me proporcionar esta oportunidade.

A minha orientadora, Cecília, pela motivação, ensinamentos, pelas críticas construtivas, pela inspiração, quando esta me faltou, e orientação sempre pontual.

Ao meu pai (em memória) e minha mãe pelo exemplo, carinho e apoio, por ajudar a transformar o meu sonho realidade. A eles meu agradecimento e carinho eternos.

A minha avó e tios por estarem sempre presentes em minha jornada, pelo apoio e paciência.

Aos irmãos pelas brincadeiras da infância e companheirismo que ajudaram em toda a minha formação.

Ao meu noivo pelo companheirismo e compreensão nas horas mais difíceis desta caminhada.

Um agradecimento especial a Dr^a Elyzabeth e Dr^a Dione, a Amanda, a Nilma, Ana Carolina, Eloane e ao Dr Fábio por se dedicarem a este trabalho, doando o seu tempo e conhecimento.

Agradeço aos meus colegas de trabalho pelo tempo, auxílio e dedicação a este trabalho, e um agradecimento especial pela minha formação profissional.

Aos meus professores por toda a educação até aqui, que me faz uma pessoa, uma cidadã e uma profissional melhor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ca invasor- Carcinoma/ Adenocarcinoma
- CAAE- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CDK- Ciclina Dependente de Kinase
- CEP- Comitê de Ética em Pesquisa
- DAPC- Departamento de Anatomia Patológica e Citopatologia
- DNA- Ácido Desoxirribonucleico
- HE- Hematoxilina & Eosina
- HPV- *Human Papiloma Virus, Papilomavirus humano*
- HSIL- *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*, Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
- IFF- Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
- INCA- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
- LAST- *Lower Anogenital Squamous Terminology*
- LCR- *locus control region*, Região controladora
- LSIL- *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*, Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
- NIC- Neoplasia Intraepitelial Cervical
- OMS- Organização Mundial da Saúde
- ORP- *Open Reading Frames*, Fases de Leitura Aberta
- PBS- Phosphate-buffered Saline, Tampão Fosfato-salino
- pRb- proteína Retinoblastoma

SUS- Sistema Único de Saúde

TMA- *Tissue microarray*

X²- Teste estatístico Qui-quadrado

RESUMO

O câncer do colo do útero é uma das neoplasias malignas mais frequentes na população feminina, possui uma evolução geralmente lenta, permitindo o rastreamento, diagnóstico e tratamento de suas lesões precursoras, prevenindo o desenvolvimento do câncer. A reprodutibilidade diagnóstica dos exames citopatológicos e histopatológicos do colo do útero, entre outros elementos, é fundamental para a efetividade de um programa de prevenção eficaz. Este estudo visou avaliar a expressão imuno-histoquímica da p16 e Ki-67 e seu impacto na variabilidade diagnóstica nos diagnósticos das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) em biópsias de colo uterino do Departamento De Anatomia Patológica do Instituto Nacional da Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, da Fundação Oswaldo Cruz (IFF/Fiocruz). Foram avaliados 379 casos para p16 e 376 para Ki-67 por três patologistas independentes. Os parâmetros de marcação imuno-histoquímicos descritos foram avaliados em relação às categorias diagnósticas e calculadas a concordância diagnóstica interobservador usando a coloração de rotina (HE) e após o uso de cada marcador. Nossos achados permitiram concluir que houve correlação positiva entre as marcações de p16 e Ki-67 com as categorias de NIC ($p < 0,0001$). O uso do p16 melhora a reprodutibilidade diagnóstica de substancial para excelente quando o objetivo é separar as lesões de alto grau e câncer das lesões de baixo grau e Não NIC. O uso do Ki-67 não melhorou a reprodutibilidade diagnóstica. A categoria NIC 2 se mostrou negativa para p16 e Ki-67 em cerca de metade dos casos sugerindo que essa categorização diagnóstica não é tão confiável para definição de conduta clínica. O uso desses marcadores reduziria a indicação de tratamentos em cerca de 9% dos casos, enquanto que 4% dos casos acompanhados deveriam ter sido tratados.

Palavras-chave: neoplasia intraepitelial cervical, colo uterino, biópsia, imuno-histoquímica, p16 e Ki-67.

ABSTRACT

Cervical Cancer is one of the most frequent malignancies in the female population. The slow evolution allows the screening, diagnosis and treatment of its precursor lesions, preventing the development of cancer. The diagnostic reproducibility of cytopathology and histopathology of the cervix, among other elements, is fundamental for the effectiveness of the prevention program. This study aimed to evaluate the immuno-histochemical expression of p16 and Ki-67 and its impact on the diagnostic variability of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in cervical biopsies of the Department of Pathology of the Instituto Nacional da Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF). Three independent pathologists evaluated 379 cases for p16 and 376 for Ki-67. The patterns of immuno-reactivity described were evaluated in relation to the diagnostic categories and the interobserver diagnostic reproducibility of using the routine staining was calculated for each marker. Our findings allowed us to conclude that the Ki-67 and p16 markers are positively related to the CIN categories ($p < 0.001$). The use of p16 improves diagnostic reproducibility from substantial to excellent when separating high grade lesions and cancer from low grade lesions and non-CIN. The use of Ki-67 did not improve diagnostic reproducibility. CIN 2 was negative for Ki-67 and p16 in about half of the cases, suggesting that this diagnostic categorization is not as reliable for defining excisional therapeutic. If these markers were used approximately 9% of the treated cases would have been avoided, while 4% of the followed cases would have been treated.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia, uterine cervix, biopsy, immunohistochemistry, p16 and Ki-67.

Sumário

1. Introdução	16
2. Justificativa	19
3. Objetivo	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos:.....	23
4. Referencial teórico	24
4.1. História Natural do Câncer de colo uterino.....	24
4.2. HPV.....	24
4.2.1 <i>Carcinogênese viral</i>	25
4.3. Rastreamento das lesões precursoras e invasivas do colo uterino.....	27
4.4. Diagnóstico das lesões precursoras do câncer do colo do útero	28
4.5. Variabilidade diagnóstica.....	31
4.6. Marcadores imuno-histoquímicos.....	33
4.6.1 <i>p16</i>	34
4.6.2 <i>Ki-67</i>	39
5. Hipótese	40
6. Material e Métodos	41
6.1. Critérios de inclusão e exclusão.....	41
6.1.1. <i>Critérios de Inclusão</i>	41

6.1.2. Critérios de Exclusão.....	42
6.2. Coloração de Hematoxilina e Eosina	42
6.3. Reações Imuno-histoquímicas	42
6.4. Critérios Diagnósticos	44
6.5. Registro dos dados e análise estatística	45
6.6. Considerações éticas e financiamento.....	46
7. Resultados	47
8. Discussão	64
Referências Bibliográficas	78

Lista de tabelas

Tabela 1. Distribuição dos diagnósticos em HE.	48
Tabela 2. Parâmetros de marcação de p16 por diagnóstico de consenso na HE.	49
Tabela 3. Perfil de marcação imuno-histoquímica de p16 em relação ao consenso de HE em duas e em cinco categorias diagnósticas.	50
Tabela 4. Positividade do p16 em relação ao consenso de HE de acordo com o perfil de marcação.	50
Tabela 5. Parâmetros de marcação de Ki-67 por diagnóstico de consenso na HE.	51
Tabela 6. Perfil de marcação imuno-histoquímico de Ki-67 em relação ao consenso de HE em duas e em cinco categorias diagnósticas.	52
Tabela 7. Positividade da Ki-67 em relação ao consenso de HE de acordo com o perfil de marcação.	53
Tabela 8. Concordância interobservador não ponderada do perfil de marcação imuno-histoquímico de p16.	55
Tabela 9. Concordância interobservador não ponderada do perfil de marcação imuno-histoquímico de Ki-67.	55
Tabela 10. Concordância interobservador não ponderada e ponderada no HE em todas as categorias diagnósticas e nas categorias de gravidade.	56
Tabela 11. Concordância interobservador não ponderada e ponderada de p16 em todas as categorias diagnósticas e nas categorias de gravidade.	57
Tabela 12. Concordância interobservador não ponderada e ponderada de Ki-67 em todas as categorias diagnósticas e nas categorias de gravidade.	58

Tabela 13. Correlação do diagnóstico consenso na HE e diagnóstico de consenso do p16.	60
Tabela 14. Correlação do diagnóstico de consenso na HE e diagnóstico de consenso de p16 na categorização diagnóstica NIC 1 – e NIC 2 +.	61
Tabela 15. Correlação do diagnóstico do consenso de HE e diagnóstico de consenso do Ki-67.....	61
Tabela 16. Correlação do diagnóstico de consenso na HE e diagnóstico de consenso de Ki-67 na categorização diagnóstica NIC 1 – e NIC 2 +.	62
Tabela 17. Correlação do diagnóstico de consenso do p16 e diagnóstico de consenso do Ki-67.....	62
Tabela 18. Correlação do diagnóstico de consenso de p16 e diagnóstico de consenso de Ki-67 na categorização diagnóstica NIC 1 – e NIC 2 +.	63

Lista de figuras

Figura 1. Esquema gráfico da ação das oncoproteínas virais E6 e E7 na carcinogênese induzida por HPV de alto risco.....	26
Figura 2. Lesões intraepiteliais cervicais coradas em HE..	30
Figura 3. Esquema representativo da técnica de Imuno-histoquímica.....	34
Figura 4. Representação esquemática da atuação de p16 na regulação do ciclo celular.....	35
Figura 5. Biópsia cervical com lesão intraepitelial corada por HE e marcada por p16.....	37
Figura 6. Casos com discrepância na interpretação de p16..	38
Figura 7. Fluxograma demonstrativo da inclusão e aproveitamento dos casos para análise de concordância diagnóstica.....	47
Figura 8. Padrão de marcação mais frequente para p16 e Ki-67 em cada categoria diagnóstica de acordo com o consenso HE..	54
Figura 9. Concordância interobservador (Kappa) por categoria diagnóstica de HE...	59

Lista de Quadros

Quadro 1. Nomenclatura citopatológica e histopatológica	28
Quadro 2. Painel de anticorpos utilizados na marcação imuno-histoquímica.	44
Quadro 3. Categorização dos diagnósticos realizados em HE para efeito de análise.....	45
Quadro 4. Variabilidade interobservador em HE e P16.....	69

Lista de anexos

Anexo 1. Formulário de análise de lâminas	83
Anexo 2. Parecer Consubstanciado do CEP	84
Anexo 3. Orçamento do projeto submetido para captação de fomento em 2013..	87

1. Introdução

O câncer do colo do útero é uma das neoplasias malignas mais frequentes na população feminina, possui uma evolução geralmente lenta, permitindo o rastreamento, diagnóstico e tratamento de suas lesões precursoras, prevenindo o desenvolvimento do câncer. A reprodutibilidade diagnóstica dos exames citopatológicos e histopatológicos do colo do útero, entre outros elementos, é fundamental para a efetividade de um programa de prevenção eficaz.

O seguimento e o tratamento adequados das lesões invasivas e precursoras do colo do útero dependem, especialmente, do diagnóstico histopatológico correto. Além disso, o estabelecimento de mecanismos de controle de qualidade e de educação continuada dos profissionais envolvidos nesse diagnóstico é fundamental para garantir precisão dos resultados dos exames.

A reprodutibilidade do diagnóstico histopatológico das lesões de colo uterino é moderada e pode gerar um impacto negativo na paciente. A subjetividade na análise, que depende da avaliação do patologista, pode levar a um sub ou sobrediagnóstico.

O subdiagnóstico das lesões precursoras retardaria o tratamento e, assim, postergaria o possível diagnóstico de lesões invasivas não suspeitadas ou, eventualmente, permitiria a progressão da doença para a fase invasiva. O sobrediagnóstico, por outro lado, levaria a condutas indevidamente invasivas, com excisão ou destruição de lesões com baixo risco de progressão para o câncer. Esse fato se torna mais relevante quando se trata de pacientes em idade

reprodutiva sem prole constituída, pois o tratamento pode aumentar o risco de complicações perinatais e infertilidade.

A utilização de ferramentas para melhorar a reprodutibilidade diagnóstica pode ser útil para a definição mais precisa de quais lesões representam, de fato, uma lesão precursora do câncer do colo uterino e, assim, merecedora de tratamento. Essa possibilidade é especialmente importante no diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau 2 (NIC 2), que costuma ter a menor concordância diagnóstica.

Evidências científicas sugerem o uso de biomarcadores, destacando-se o p16 e o Ki-67, para auxílio no diagnóstico histopatológico e como marcadores prognósticos das lesões intraepiteliais do colo uterino.

Apesar da maioria dos artigos sugerirem benefício do uso do marcador p16 para melhorar a concordância diagnóstica, alguns artigos mais recentes têm apontado as limitações do seu uso de rotina em todos os casos. Alguns artigos indicam que o Ki-67 poderia ser de auxílio na definição diagnóstica, mas ainda não há consenso sobre em que situações estaria melhor indicada sua utilização.

Em 2012 foi sugerida a utilização da Terminologia das Lesões Escamosas do Trato Anogenital Inferior (*Lower Anogenital Squamous Terminology - LAST*) que, entre outras recomendações, indica o uso do p16 em todas as amostras de NIC 2 para definir se essa lesão seria de alto ou de baixo grau.

Como a técnica de imuno-histoquímica não está disponível na maioria dos hospitais do Sistema Único de Saúde (SUS), a melhor compreensão das vantagens e das limitações da utilização desses marcadores pode nortear a

implementação e fundamentar a incorporação dessa tecnologia na rede pública de saúde.

O objetivo deste estudo é verificar se a utilização de marcadores imunohistoquímicos para p16 e Ki-67 melhoram a concordância diagnóstica inter-observador das biópsias do colo uterino no Departamento de Anatomia Patológica e Citopatologia- DAPC do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, da Fundação Oswaldo Cruz (IFF/Fiocruz) e em que categorias diagnósticas essa contribuição é mais evidente.

2. Justificativa

O câncer do colo do útero é uma das neoplasias malignas mais frequentes na população feminina. Excetuando o câncer de pele não melanoma, ocupa o terceiro lugar em todo o país, sendo superado apenas pelo câncer de mama e colorretal. O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou cerca de 16.340 casos novos da doença em 2016 e 2017.¹ A carcinogênese do colo do útero geralmente é lenta e os aspectos epidemiológicos e etiológicos (que incluem a relação com a infecção por diferentes tipos de *Papilomavírus humano*, o HPV) estão bem definidos, bem como a evolução do processo, que possui fases precursoras, conhecidas como NIC e fases invasivas, onde estão as lesões microinvasoras ou invasoras.²⁻⁴

A detecção precoce das neoplasias do colo do útero, por meio do exame citopatológico (teste de Papanicolaou) permite a identificação das lesões precursoras^{1,2} e proporciona uma maior chance de cura, além da utilização de métodos terapêuticos conservadores.²⁻⁴

O resultado do exame citopatológico irá definir quais pacientes serão submetidas à avaliação colposcópica e durante a colposcopia pode ser indicado o tratamento. Todavia, em alguns casos, pode ser necessária a realização de biópsia para confirmação diagnóstica e definição da conduta clínica.^{3,5}

O diagnóstico histopatológico de NIC 2 e 3, consideradas lesões precursoras do câncer de colo uterino, numa biópsia, na maioria das vezes, implica num procedimento excisional de uma porção do colo uterino a fim de confirmar o diagnóstico, tratar a lesão e prevenir a progressão para câncer.

Todavia, a avaliação histopatológica é subjetiva e observador dependente, podendo ocorrer, em alguns casos, o sobrediagnóstico ou subdiagnóstico, o que pode levar a uma abordagem inadequada, reforçando a importância de um diagnóstico preciso.⁶⁻⁸

Estudos anteriores têm mostrado uma concordância diagnóstica moderada no exame histopatológico de biópsias do colo uterino usando a coloração de rotina (Hematoxilina-Eosina – HE). Segundo Palma *et al.* (2009), a reprodutibilidade diagnóstica é fundamental para a implementação de um programa de rastreio eficaz. Estudos internacionais têm obtido valor de Kappa ponderado, teste estatístico para medir concordância, entre 0,20-0,54, considerado de fraco a moderado. Esse valor pode variar de acordo com o número de patologistas avaliadores, o número de categorias diagnósticas e gravidade da lesão.^{6,9,10}

O diagnóstico histopatológico de NIC 2 parece ser um dos mais difíceis, pois é a categoria de menor concordância diagnóstica em estudos anteriores.^{6,7} No DAPC (IFF/Fiocruz), em estudo anterior, a concordância diagnóstica variou de moderada a substancial na coloração de rotina (HE), sendo NIC 2 a categoria de pior concordância (30,6%).¹¹

Um estudo de controle de qualidade realizado nos Estados Unidos demonstrou que 56,6% (296 de 523 casos) das biópsias de colo diagnosticadas como NIC 2 no centro onde as mulheres foram atendidas receberam diagnósticos diferentes quando foram avaliadas pelo grupo de controle de qualidade de Patologia.¹²

Tendo em vista a subjetividade envolvida na análise histológica, os fatores pré-analíticos que podem influenciá-la, e que o resultado histopatológico norteia as

decisões de tratamento e seguimento clínico, tem sido buscado marcadores biológicos que possam auxiliar no diagnóstico e classificação das NIC. Os dois marcadores mais citados na literatura, para esse fim, são p16 e Ki-67.

A maioria dos estudos sobre a possível utilidade desses marcadores no diagnóstico das NIC evidencia melhora da concordância diagnóstica com a utilização do marcador p16.¹³⁻¹⁷ Uma metanálise sobre o assunto, publicada em 2014, onde cinco artigos puderam ser incluídos, concluiu que a avaliação da marcação imuno-histoquímica para p16 melhora a concordância diagnóstica de NIC 2 ou lesões mais graves (NIC 2+), mas o mesmo não ocorre de forma significativa na categoria de NIC 3 ou lesões mais graves (NIC 3+).¹⁸

O estudo de Pacchiarotti *et al.* (2014) observou que a avaliação da imunomarcação para p16 em todas biópsias do colo uterino num programa de rastreio, com patologistas experientes, não teve efeito na reprodutibilidade diagnóstica¹⁹

Outros estudos, além de demonstrarem melhora na concordância diagnóstica com o uso do marcador p16, observaram o mesmo com o uso do marcador Ki-67²⁰⁻²². Um estudo realizado na Santa Casa de São Paulo – Brasil, apesar de ter encontrado uma melhora na concordância diagnóstica com o uso desses dois marcadores, evidenciou que ambos os marcadores têm baixa acurácia diagnóstica.²³

Apesar de muitos dados na literatura serem favoráveis ao uso da técnica de imuno-histoquímica para p16 como uma boa ferramenta para melhorar a reprodutibilidade diagnóstica das NIC, ainda há necessidade de melhor precisar em que categoria diagnóstica seria mais indicado o seu uso, quais seriam os

melhores pontos de corte para considerar uma marcação positiva ou negativa, qual a acurácia diagnóstica desses marcadores e quais seriam os impactos clínicos desse uso.

Este estudo ganha ainda mais relevância após a recomendação do projeto da LAST indicar o uso da marcação imuno-histoquímica para p16 nas amostras de NIC 2 e propor a classificação dicotômica das NIC em alto e baixo grau, classificando as NIC 2 de acordo com o resultado da marcação de p16 numa dessas categorias. Com este trabalho tivemos a oportunidade de avaliar o efeito desses marcadores (p16 e Ki-67) na concordância diagnóstica das lesões do colo uterino, no contexto do DAPC- IFF, gerando dados que poderão contribuir para o uso desses marcadores na rotina diagnóstica das unidades de saúde.²⁴

3. Objetivo

3.1. Objetivo geral

Estudar os aspectos morfológicos e a variabilidade diagnóstica em lesões precursoras do câncer de colo uterino utilizando os marcadores imunohistoquímicos para p16 e Ki-67.

3.2. Objetivos específicos:

- 1- Descrever a distribuição e intensidade da marcação para p16 e Ki-67 em biópsias de lesões precursoras cervicais.
- 2- Verificar se há correlação entre a distribuição e intensidade da marcação para p16 e Ki-67 e os diagnósticos realizados em Hematoxilina-Eosina (HE).
- 3- Comparar a concordância diagnóstica interexaminadores por categoria de NIC nas lâminas coradas em HE e nas lâminas marcadas para p16 e Ki-67.
- 4- Identificar em que situações estaria melhor indicado o uso dos marcadores p16 e Ki-67.
- 5- Analisar o possível impacto clínico da redução da variabilidade interexaminador ao se utilizar a marcação para p16 e Ki-67 por categoria diagnóstica de NIC em função dos diagnósticos finais (qual o percentual de subtratamento e sobretratamento que seriam evitados).

4. Referencial teórico

4.1. História Natural do Câncer de colo uterino

O desenvolvimento do câncer do colo uterino é resultado da progressão de lesões precursoras, as NIC 2 e 3 e o adenocarcinoma. A maioria das NIC, especialmente as de grau 1, tende a regredir naturalmente, porém estas lesões podem progredir para o câncer ao longo do tempo. O surgimento das NIC ocorre geralmente em mulheres jovens, em torno dos 30 anos, porém têm uma progressão lenta, podendo levar anos para chegar até a doença invasiva. Portanto mulheres mais velhas tem um risco maior de apresentar o câncer de colo uterino. O longo intervalo entre a lesão precursora e o surgimento do câncer permite o rastreamento e prevenção dessa doença.²⁵

Já foi estabelecido que o principal fator para o desenvolvimento das NIC e do câncer do colo uterino é a infecção persistente pelos tipos oncogênicos do *Papillomavírus humano* (HPV). O HPV está descrito como fator necessário para o desenvolvimento das lesões precursoras e o câncer de colo uterino.²⁵

4.2. HPV

O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus*. São vírus não envelopados e com DNA de dupla fita circular e cerca de 8.000 pares de bases. Mais de 200 tipos de HPV foram identificados e cerca de 40 infectam o trato genital feminino.²⁵

Alguns HPV são classificados em função de sua associação com lesões invasivas em alto, baixo ou intermediário risco oncogênico. Os HPV de alto risco

são representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59, os de baixo risco oncogênico, pelos tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81 e os possivelmente ou provavelmente carcinogênicos pelos tipos 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 e 82. O HPV de alto risco tem a capacidade de integrar o seu genoma ao genoma da célula hospedeira.²⁵

Esse vírus é transmitido através de contato sexual, atingindo sua maior prevalência em mulheres na faixa etária de 22 aos 25 anos, porém sua detecção decresce conforme a faixa etária aumenta, demonstrando que a maioria das infecções apresenta regressão espontânea.

4.2.1 Carcinogênese viral

O HPV penetra nas células da camada basal do epitélio escamoso cervical, podendo acarretar mutação gênica e a multiplicação destas células anormais, sendo este o principal mecanismo da carcinogênese cervical.²⁵

A carcinogênese cervical parece se iniciar a partir da integração do DNA do HPV ao DNA da célula hospedeira. Esse processo tem como consequência a ativação de oncogenes ou inativação dos genes reguladores do ciclo celular que suprimem a ocorrência de tumores ou de ambos os processos. Os oncogenes *E6* e *E7* são traduzidos em proteínas virais que tem papel fundamental na formação de tumores, pois estas proteínas atuam na desregulação do ciclo celular.^{25,26}

A oncoproteína E6 tem a capacidade de degradação da p53, proteína reguladora do ciclo celular (G1/S e G2/M), reduzindo seus níveis na célula hospedeira e permitindo que a replicação do DNA viral ocorra. A ligação da E6 com a p53 impede a apoptose celular mediada por essa proteína (Figura 1).^{25,26}

A oncoproteína E7 tem a capacidade de se ligar a proteína do Retinoblastoma (pRb) resultando na liberação do fator E2F. Esse fator ativa os genes relacionados com a transição da fase G1/S do ciclo celular, suprimindo o controle do ciclo exercido pela pRb. A E7 também se liga a outros fatores regulatórios do ciclo celular como, por exemplo, p21 e p27, que bloqueiam efeitos de proteínas supressoras tumorais (Figura 1).^{25,26}

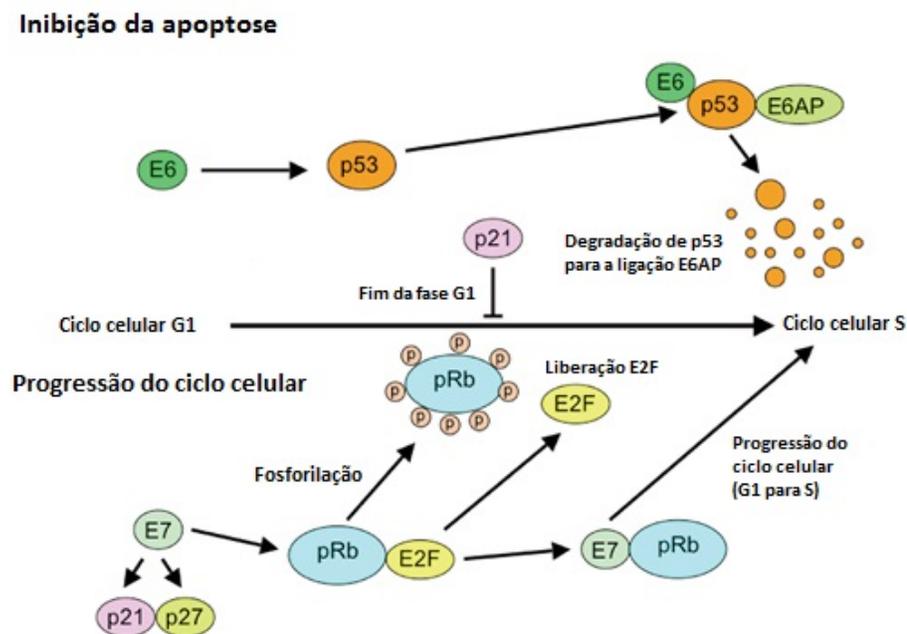


Figura 1. Esquema gráfico da ação das oncoproteínas virais E6 e E7 na carcinogênese induzida por HPV de alto risco. Fonte: adaptado de Senba 2012²⁷

Desta forma as células resultantes de mutação pela ação das oncoproteínas virais podem se multiplicar descontroladamente e levar ao desenvolvimento de lesões precursoras do câncer de colo uterino e, dessas, evoluírem para o câncer.^{25,26}

4.3. Rastreio das lesões precursoras e invasivas do colo uterino

O rastreio do câncer de colo uterino tem como objetivo detectar as lesões precursoras e o câncer em estado inicial, assintomáticos. Isso é possível graças ao longo período de evolução até o câncer francamente invasor.²⁸

O exame citopatológico do colo uterino (Papanicolaou) é o teste mais utilizado atualmente para rastreio. Consiste no exame microscópico de células esfoliadas do colo uterino coradas pelo método de Papanicolaou.^{1,3} No Brasil, o exame citopatológico cervical é recomendado para mulheres de 25 a 64 anos, sendo indicada sua realização a cada três anos após dois exames negativos com intervalo de um ano.²

Dependendo dos achados citológicos, a mulher deve ser submetida à colposcopia. Esse exame é realizado sob visão magnificada do colo uterino com o auxílio de um colposcópio e após a aplicação de reagentes. Tem o objetivo de identificar áreas anormais e sua localização, definindo a necessidade da realização de biópsias ou de um procedimento excisional. O exame histopatológico dos espécimes eventualmente obtidos fundamenta o diagnóstico e define o tratamento e o seguimento.^{4,26}

Nas pacientes diagnosticadas com NIC 1, em geral, será realizado apenas o seguimento clínico/citológico/colposcópico, pois estas lesões têm grande índice de regressão espontânea.²

Nas pacientes diagnosticadas com NIC 2 e 3, o tratamento, na maioria das mulheres, consiste na excisão da zona de transformação.²

4.4. Diagnóstico das lesões precursoras do câncer do colo do útero

A nomenclatura para o diagnóstico das lesões precursoras do câncer do colo do útero sofreu diversas alterações ao longo do tempo (Quadro 1). Em 1941, George Papanicolaou classificou as alterações citológicas em cinco classes, numeradas de I a V, sendo a classe III sugestiva de malignidade, mas não conclusiva, a classe IV altamente sugestiva de malignidade e a classe V conclusiva de malignidade.²

Quadro 1. Nomenclatura citopatológica e histopatológica utilizada desde o início do uso do exame citopatológico para o diagnóstico das lesões cervicais e suas equivalências*

Classificação citológica de Papanicolaou (1941)	Classificação histológica da OMS (1952)	Classificação histológica de Richart (1967)	Sistema Bethesda (2001)	Classificação Citológica Brasileira (2006)
Classe I	-	-	-	-
Classe II	-	-	Alterações benignas	Alterações benignas
-	-	-	Atipias de significado indeterminado	Atipias de significado indeterminado
Classe III	Displasia leve	NIC I	LSIL	LSIL
	Displasia moderada e acentuada	NIC II e NICIII	HSIL	HSIL
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	HSIL Adenocarcinoma <i>in situ</i> (AIS)	HSIL AIS
Classe V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

*Reproduzido de Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero /Instituto Nacional do Câncer 2016².

Na década de 1950, começaram a ser utilizadas terminologias que permitiam traduzir os diagnósticos citológicos em diagnósticos histológicos. Essas terminologias foram adotadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1952 e denominavam as lesões intraepiteliais como “displasias”.²⁸

O conceito de NIC foi estabelecido por Richart, em 1967, para lesões precursoras do carcinoma escamoso invasor do colo uterino. Estas lesões foram

classificadas histologicamente em três graus: NIC 1, NIC 2 e NIC 3 conferindo um caráter progressivo entre essas categorias.²⁸

No final da década de 80 um novo sistema de classificação citológica cervical foi criado, na cidade de Bethesda, nos Estados Unidos visando padronizar os diagnósticos e facilitar o manejo clínico das NIC. Nesse sistema, passou-se a utilizar o termo “lesão intraepitelial”, designando como de baixo grau (LSIL- *Low-grade squamous intraepithelial lesion*) as alterações citológicas equivalentes à NIC 1 e de alto grau (HSIL- *High-grade squamous intraepithelial lesion*) , aquelas equivalentes à NIC 2 e 3.¹

Baseado no Sistema Bethesda, Richart transportou os conceitos citológicos para a histologia e, considerando conhecimentos da época relacionados ao estado do vírus nas células e a história natural conhecida para as lesões, propôs a utilização de duas categorias de diagnóstico histopatológico: neoplasias intraepiteliais escamosas de baixo grau (incluindo as NIC 1) e neoplasias intraepiteliais escamosas de alto grau (incluindo as NIC 2 e NIC 3).²⁹

As NIC têm como característica histológica a presença de células imaturas ou pouco diferenciadas ocupando porções variáveis do epitélio cervical.^{2,30,31}

A classificação das NIC é baseada na proporção da ocupação das células atípicas na espessura do epitélio cervical. As lesões mais graves apresentam maior proporção de células imaturas e, desta forma, apresentam poucas camadas de células diferenciadas e maduras restritas ao epitélio mais superficial. Estas lesões apresentam células em mitose fora da camada basal e, à medida que a lesão progride, o número de mitoses nas camadas mais superficiais aumenta.

Quanto menor a diferenciação do epitélio, maior é o número de mitoses ao longo da sua espessura.^{31,32}

As NIC 1 ou lesões de baixo grau são as lesões de menor gravidade e tendem a regredir sem tratamento médico, portanto estas lesões não são consideradas lesões precursoras do câncer de colo uterino. Essas lesões têm como características a presença das alterações citopáticas induzidas pelo HPV (coilocitose, irregularidade nuclear, binucleação, disceratose) nos terços superficiais do epitélio e a presença de células mais imaturas e figuras de mitose restritas ao terço mais profundo do epitélio (Figura 2).^{30,33}

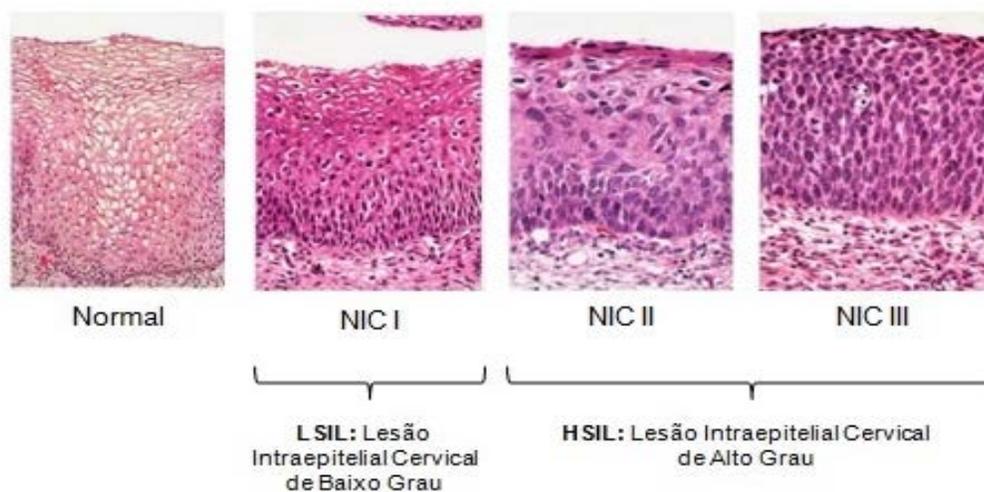


Figura 2. Lesões intraepiteliais cervicais coradas em HE. Fonte: adaptado de Robbins e Cotran 2010.³⁴

As NIC 2 e 3 ou lesões de alto grau têm como características um epitélio com células indiferenciadas ocupando os dois terços mais profundos do epitélio nos casos de NIC 2 e, no caso da NIC 3, mais de dois terços até a totalidade da espessura do epitélio. Ambas as lesões apresentam um número aumentado de mitoses e células com anisocariose e hiperchromasia (Figura 2).³¹

4.5. Variabilidade diagnóstica

Segundo Palma *et al.* (2009), a reprodutibilidade diagnóstica dos exames citopatológicos e histopatológicos do colo do útero é fundamental para a implementação de um programa de rastreio eficaz. Além disso, laudos de histologia são geralmente usados como desfechos relevantes para medir o impacto das novas tecnologias de rastreamento e vacinas.⁷

Frequentemente a biópsia guiada por colposcopia define o tratamento a ser realizado, porém baseia-se na avaliação histológica, que é subjetiva e dependente da experiência do avaliador, implicando em razoável variabilidade diagnóstica. Em consequência, a paciente pode ser sobretratada ou subtratada a partir de um resultado de exame histopatológico equivocado.^{9,28,32,35}

O tratamento das NIC pode acarretar em risco de complicações obstétricas, como por exemplo, prematuridade e de infertilidade. De acordo com o estudo de Bruinsma (2011), a realização de tratamento excisional aumenta em 2,19 o risco relativo de nascimento prematuro. Trata-se de um risco aceitável quando se pretende confirmar a ausência de doença invasiva e se deseja impedir a progressão de uma lesão pré-invasiva para doença invasiva. Todavia, é inaceitável quando se trata de uma lesão com baixo risco de progressão.³⁶ Essa é a base para as recomendações de não tratamento das NIC 1, em geral, e das NIC 2 em mulheres até 24 anos. Já nas demais mulheres, a NIC 2 indica a necessidade de tratamento, de preferência excisional, independente da prole. O sobrediagnóstico de uma NIC 1 como NIC 2 ou de uma NIC 2 como NIC 3 pode, dependendo da idade da paciente, implicar em tratamento e riscos desnecessários para sua vida reprodutiva.² Em cenários onde ainda são equivocadamente

utilizados procedimentos menos conservadores, como a amputação do colo e a histerectomia, o sobretratamento traz, evidentemente, maior risco à saúde da mulher.

No caso do subdiagnóstico, a não intervenção baseada num diagnóstico de menor relevância pode retardar a identificação de lesões invasivas não suspeitadas ou permitir, em longo prazo, a progressão de lesões precursoras para doença invasiva.^{9,36}

Melhorar a reprodutibilidade diagnóstica do exame histopatológico de espécimes do colo uterino é um desafio. Nesse contexto é particularmente complicado medir a sensibilidade e especificidade do diagnóstico pela dificuldade de estabelecer um padrão-ouro; a lesão representada na biópsia nem sempre corresponde à área mais grave da lesão do colo uterino, algumas lesões biopsiadas podem regredir ou terem sido totalmente retiradas no procedimento da biópsia. Essa limitação dificulta a análise do desempenho diagnóstico das biópsias de colo do útero coradas por HE ou após o uso de imunomarcadores. Assim, buscar alternativas para melhorar a concordância diagnóstica é uma forma indireta de melhorar a qualidade diagnóstica.⁶⁻⁹

Alguns estudos que avaliaram a concordância diagnóstica utilizando a coloração de rotina obtiveram um valor de Kappa variando de 0,05 a 0,58 quando não ponderado e de 0,20 a 0,65 quando ponderado, ou seja, variando de fraco a moderado quando não ponderado e de fraca a substancial quando ponderado.^{7,9}

Outros fatores, além da subjetividade e experiência do examinador, podem influenciar a interpretação da lâmina, como, por exemplo, orientação e espessura do corte. Ainda, fatores como coleta inadequada do material, avarias durante o

processo de biópsia, ausência de epitélio escamoso, fixação e preservação inadequadas (levando a autólise tecidual) contribuem para a pior qualidade do material resultante para diagnóstico e devem ser controlados e reduzidos para melhorar a acurácia diagnóstica.^{14,22,25}

4.6. Marcadores imuno-histoquímicos

Estudos sugerem a utilização de marcadores imuno-histoquímicos como ferramenta no auxílio ao exame histopatológico de rotina HE, a fim de aumentar a concordância diagnóstica. Os marcadores p16 e Ki-67 têm maior repercussão no desempenho diagnóstico e estão sendo amplamente estudados.^{12,18,37}

A técnica de imuno-histoquímica baseia-se na ligação específica antígeno-anticorpo, onde o antígeno é uma proteína que se deseja detectar e o anticorpo é capaz de reconhecer essa proteína, resultando num complexo antígeno-anticorpo específico. Sua detecção pode ser direta, por meio da detecção do cromógeno realizada por uma enzima catalizadora ligada ao anticorpo (reação direta) ou indireta, por meio da adição de outro anticorpo, ligado a uma enzima catalizadora, que se liga ao complexo primário (reação indireta). O resultado final é um tecido marcado com a coloração específica do cromógeno onde se encontram os antígenos que se deseja detectar (Figura 3).³⁸

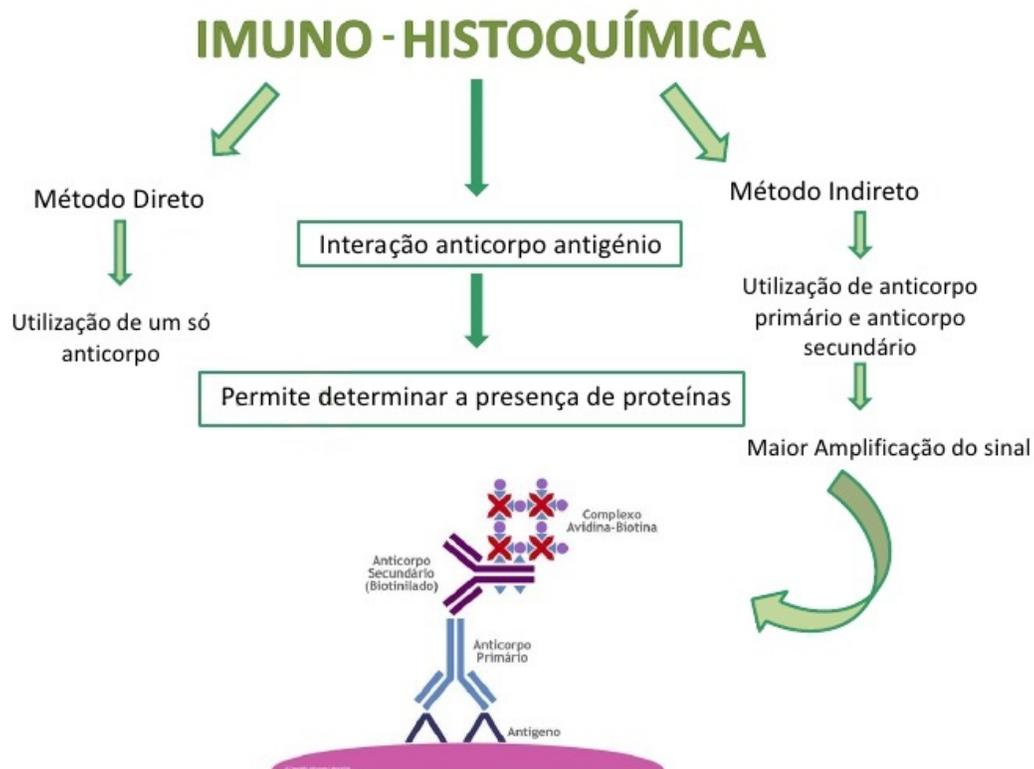


Figura 3. Esquema representativo da técnica de Imuno-histoquímica. Fonte: Slid-share.net: Patologia gástrica, Ana Muniz e Cláudia Correia-2009³⁹

4.6.1 p16*

Uma das proteínas envolvidas na carcinogênese cervical é a p16. Essa proteína é inibidora de ciclina dependente de quinase (*cyclin-dependent kinases* - CDK). Ao interagir com CDK-4 e CDK-6, a p16 inibe a formação de um complexo de ciclina, que é uma proteína estimulante da proliferação celular, através da inibição da fosforilação induzida por CDK da pRb. A fosforilação de pRb induz a liberação de um fator de transcrição chamado fator E2F, que estimula a expressão de genes envolvidos na transição da fase G1 para S do ciclo celular. A infecção

* O p16: está relacionado ao marcador imuno-histoquímico; a p16: está relacionado a proteína p16.

pelo HPV induz a liberação de E2F através da ligação da oncoproteína E7 a pRb, impedindo a ação da proteína p16, que se acumula no núcleo e citoplasma da célula. Desta forma, a sobre-expressão da p16 serve como um marcador da inativação da pRb. Esta expressão tende a aumentar de acordo com grau de neoplasia, apontando para uma possível utilidade no diagnóstico das NIC (Figura 4).^{13,18,19}

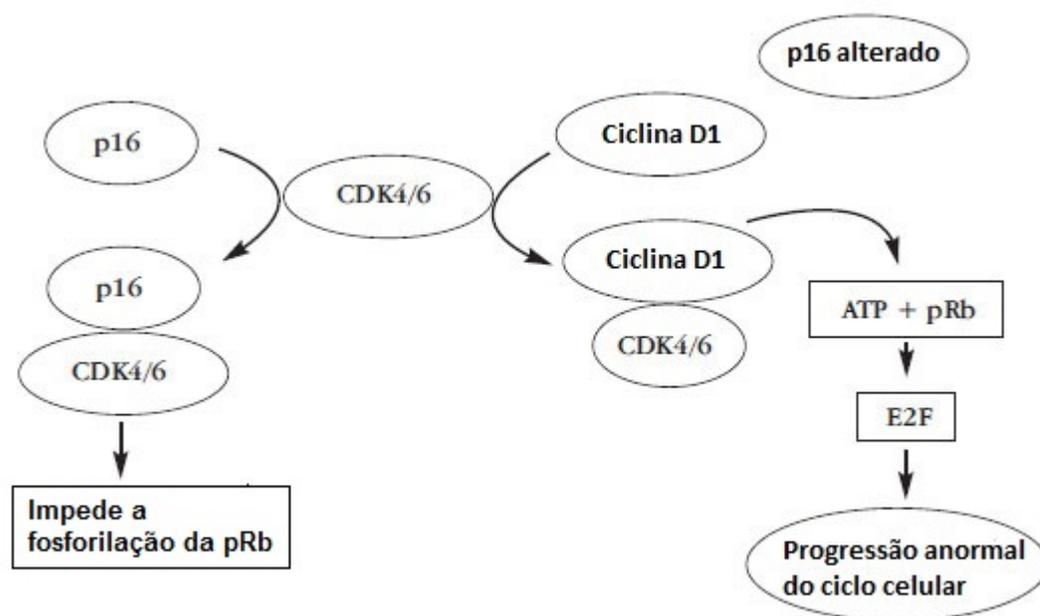


Figura 4. Representação esquemática da atuação de p16 na regulação do ciclo celular. Fonte: traduzido de Vieira, 2012⁴⁰

Segundo a meta-análise de Reuschenbach *et al.*, 2014 a utilização do p16 em conjunto com a HE demonstrou uma concordância significativamente maior nos diagnósticos de NIC 2+ e NIC 3+, quando há dúvida diagnóstica, comparados com utilização da HE somente.¹⁸

A discussão envolvendo as dificuldades diagnósticas, especialmente em casos de NIC 2, e o conhecimento sobre a carcinogênese cervical em função da atividade do HPV no interior das células levou o Colégio Americano de Patologistas e a Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical a

propor uma nova terminologia para trato anogenital inferior (LAST). Nessa proposta, é recomendada a utilização de duas categorias diagnósticas à semelhança dos diagnósticos citológicos do Sistema Bethesda: LSIL e HSIL.²⁴

O uso do biomarcador p16 foi recomendado pela LAST nas seguintes situações: para o diagnóstico diferencial entre lesões precursoras e lesões que mimetizam lesões precursoras (metaplasia escamosa imatura, atrofia, alteração regenerativa); em todos os casos de NIC 2, para definir entre pré-cancer (HSIL) ou não (LSIL); para os casos onde houver discordância entre profissionais na interpretação da amostra histológica que inclua o diagnóstico diferencial com pré-cancer.²⁴

A marcação para p16 segundo as recomendações da LAST deve ser considerada positiva se for forte e difusa em bloco (todo um segmento marcado) envolvendo um terço ou mais do epitélio, e nesse caso fundamentaria o diagnóstico da lesão como precursora do câncer. Marcação focal ou descontínua (multifocal) não são específicas e podem ser vistas em lesões de baixo grau e alterações reacionais.²⁴

Na Figura 5 podemos observar a aplicação do p16 segundo a terminologia LAST. Os quadros A e C mostram cortes corados pela HE com células atípicas na camada parabasal que se estendem para o terço médio do epitélio (NIC 2). Em B e D a mesma lesão, agora marcada pelo p16 com coloração forte, difusa em bloco. Portanto, este caso deve ser classificado como HSIL na terminologia LAST.

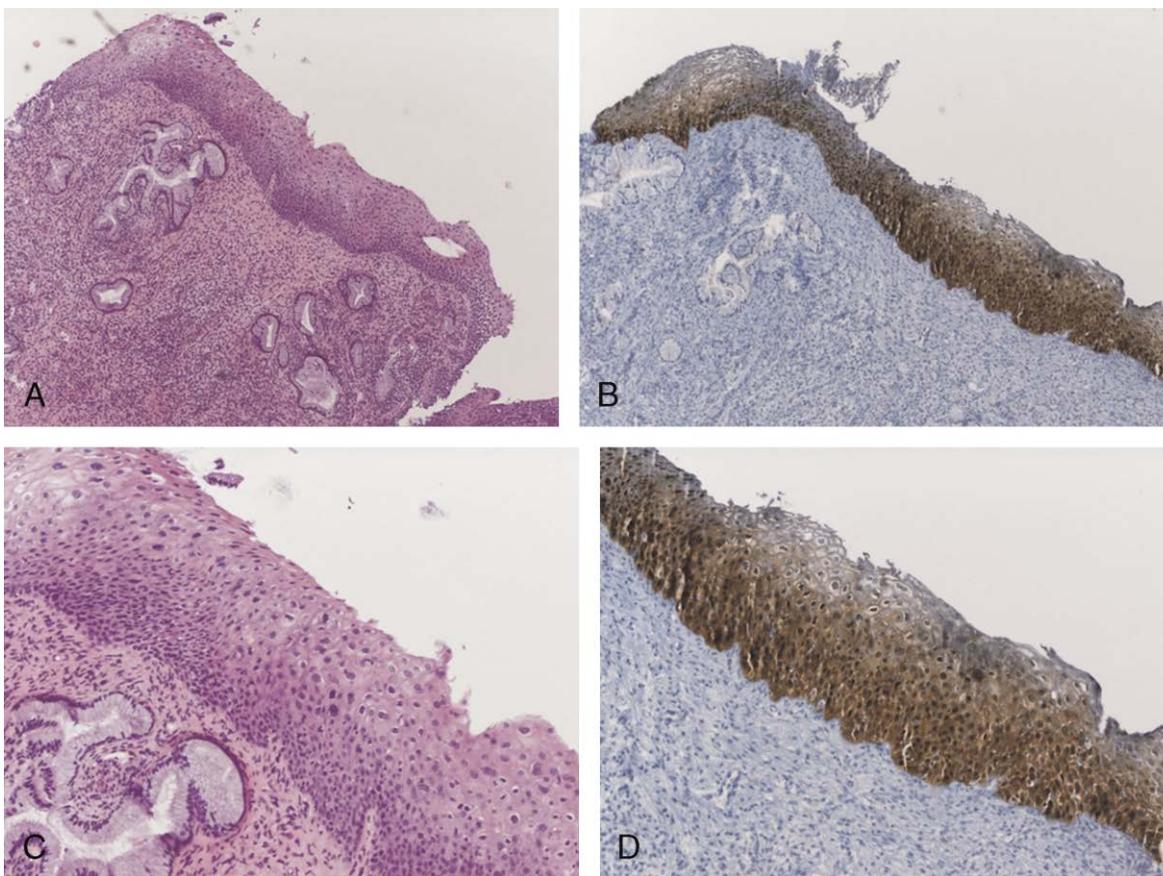


Figura 5. Biópsia cervical com lesão intraepitelial corada por HE e marcada por p16. Fonte: LAST, 2012²⁴

Estudo recente, de abril de 2016, utilizando a terminologia LAST, evidenciou sobrediagnóstico como NIC 2 ou 3 com o uso do p16 nas seguintes situações: uso desnecessário do p16 em casos inequívocos de lesão de baixo grau na coloração por HE e em lesões duvidosas na HE que foram reclassificadas como HSIL por marcações do p16 que não eram em bloco. Os autores concluíram que a padronização do ponto de corte para positividade do p16 poderia melhorar o desempenho diagnóstico quando se utiliza esse biomarcador.⁴¹

Um outro estudo obteve discordância na avaliação da positividade do p16 em 11,5% dos casos. Os casos discrepantes mostravam um dos seguintes padrões ou a sua combinação: marcação forte e difusa envolvendo menos de um

terço do epitélio; marcação difusa em um terço ou mais do epitélio, mas com intensidade mais fraca que o controle positivo; uma área focal marcada difusa e fortemente, que poderia ser interpretada como uma área focal verdadeiramente positiva ou como uma parte de um padrão não difuso de marcação; padrão de marcação forte, difusa e em bloco, mas com áreas negativas ou mais claras de permeio (padrão mosaico). Esses achados demonstram que a avaliação do marcador imuno-histoquímico também está sujeita à subjetividade em algumas situações (Figura 6).⁴²

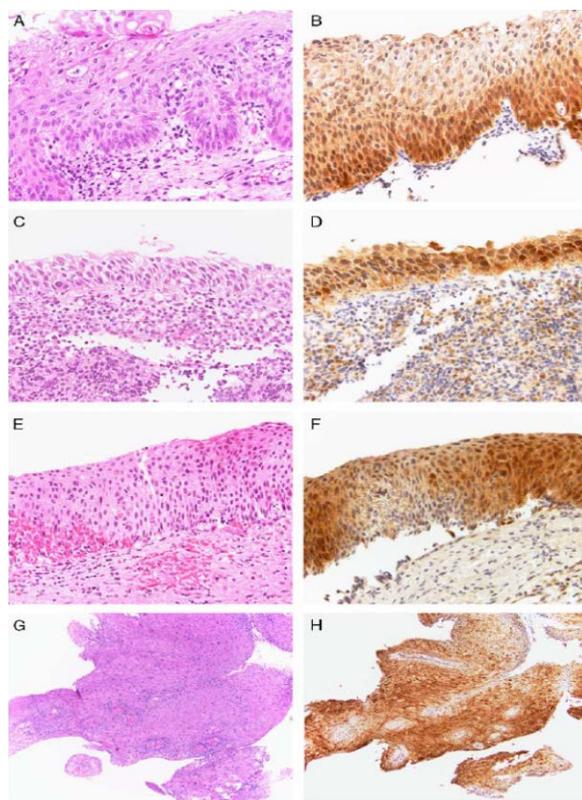


Figura 6. Casos com discrepância na interpretação do p16 (colorações em HE [A, C, E, G] e correspondente p16 [B, D, F, H]). A e B, positividade do p16 forte em banda em menos de 1/3 da espessura epitelial. A interpretação do consenso p16 foi negativa. C e D, positividade p16 fraca difusa. A interpretação do consenso p16 foi positiva. E e F, duas áreas de coloração forte (lados esquerdo e direito de F) com área negativa interveniente (padrão geral desigual versus focos de coloração difusa). A interpretação do consenso p16 foi positiva. G e H, expressão p16 forte extensa, mas com um padrão desigual ou de mosaico. A interpretação do consenso foi negativa. Fonte: Retirado e traduzido de Maniar, 2015.⁴²

4.6.2 Ki-67

Ki-67 é uma proteína nuclear não histona, necessária para proliferação celular. É considerada um marcador de proliferação celular e é expressa em todas as fases da divisão celular.

A imunomarcção de Ki-67 em epitélio escamoso de colo uterino normal deve se restringir às camadas basais, pois estão em constante renovação. Portanto, nessas camadas sempre haverá células em mitose e marcação para Ki-67. Assim, ao se detectar essa marcação em outras camadas do epitélio pode-se sugerir que há desregulação do ciclo celular induzido por HPV e presença de NIC.^{20,21,23}

Kanthiya (2016) demonstrou que a expressão de Ki-67 aumentou de acordo com a gravidade da lesão. A expressão de Ki-67 foi encontrada em todos os casos classificados como carcinoma invasivo, 75,4% em NIC 2 - 3, 22,6% NIC 1 e 11,3% em lesões não-displásicas. Há estudos que sugerem a utilização de Ki-67 em casos de dúvidas quanto à presença de NIC e na confirmação de lesões de alto grau.^{19,43}

Aslani (2013) recomenda a utilização da imunomarcção para Ki-67 associado a p16 como teste complementar na diferenciação entre lesões displásicas e não-displásicas, pois identificou que o Ki-67 foi positivo em alguns casos de metaplasia escamosa imatura, achados este não observado com o uso do p16.²²

5. Hipótese

A utilização da imuno-histoquímica para p16 e Ki67 melhora a concordância diagnóstica interobservador das biópsias do colo uterino.

6. Material e Métodos

Foi realizado estudo transversal com reanálise de casos de biópsia de colo uterino realizadas pelo setor de Patologia Cervical do IFF/Fiocruz no período de 2006 a 2014.

Os blocos das biópsias do colo do útero, armazenados no arquivo do DAPC, foram recortados em 5µm sendo submetidos à coloração de rotina (HE) e a reações imuno-histoquímicas com os anticorpos primários para p16 e Ki-67.

As lâminas resultantes foram revistas por três patologistas experientes, que fazem esses exames na rotina clínica do serviço há mais de 10 anos, atribuindo um novo diagnóstico para cada caso sem conhecimento do diagnóstico inicial ou daquele definido pelos outros dois patologistas.

O consenso foi realizado na concordância diagnóstica de pelo menos dois patologista independentes. Quando não houve concordância de pelo menos dois patologistas, a lâmina foi revista pelos 3 patologias em conjunto para decidir o diagnóstico de consenso.

Foi analisada a concordância diagnóstica interavaliador na coloração de rotina e em cada um dos marcadores imuno-histoquímicos (p16 e Ki-67).

6.1. Critérios de inclusão e exclusão

6.1.1. Critérios de Inclusão

Espécimes resultantes de biópsias de colo uterino realizadas no IFF/Fiocruz no período entre 2006 e 2014 com bloco disponível.

6.1.2. Critérios de Exclusão

Casos onde o epitélio tenha se esgotado no recorte para a realização da técnica de imuno-histoquímica.

6.2. Coloração de Hematoxilina e Eosina

Esta é a coloração avaliada pelos patologistas na rotina diagnóstica, na qual os cortes são submetidos a dois banhos de xilol, três banhos de álcool absoluto, dois banhos de água corrente para hidratação, corados em Hematoxilina de Harris, banhados em água corrente e, posteriormente, recebem um banho em álcool-ácido clorídrico a 1%, um banho de carbonato de lítio, um banho em álcool absoluto, corados em eosina amarelada a 5%, quatro banhos de álcool absoluto e dois banhos de xilol. Finalmente são montados com goma de Damar e lamínula de vidro.

6.3. Reações Imuno-histoquímicas

Os cortes das biópsias foram feitos com espessura de 5µm e montados em lâminas silanizadas[†]. Para menor índice de dobras e perdas, as lâminas foram deixadas por uma noite na estufa a 37°C.

Para desparafinização, as lâminas foram colocadas na estufa a 60°C por 30 minutos, seguido de mais dois banhos de cinco minutos no xilol, dentro da estufa. Após esta passagem pela estufa foram feitos dois banhos de xilol cada um durante cinco minutos, à temperatura ambiente. Logo após, as lâminas foram

[†] Essas lâminas são imersas em silano que otimiza a aderência entre lâmina e o corte histológico, diminuindo a possibilidade de perda ou dobras.

hidratadas em etanol absoluto (dois banhos), seguidos por dois banhos de etanol a 95% (cinco minutos cada) e dois banhos em água destilada (um minuto cada).

Para fins de inibição da peroxidase endógena, os cortes foram incubados com água oxigenada a 3%, durante 30 minutos e, então, banhados em água destilada para depois ser feita a recuperação antigênica em tampão de recuperação Trilogy® (Cell Marque).

Em seguida, para inibição das ligações inespecíficas, os cortes foram incubados com solução de proteína (*Protein Block Solution* - Kit Novolink Polymer - Leica) por 15 minutos em câmara úmida.

Os cortes foram, então, incubados por 60 minutos com anticorpo primário em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados em dois banhos de tampão fosfato-salino (*Phosphate-buffered Saline* - PBS) por dois minutos cada, seguido da adição do anticorpo secundário por 30 minutos e, depois, incubados com sistema de detecção polímero (NovolinkPolymer) por 30 minutos. O sinal foi visualizado com cromógeno DAB (Diaminobenzidina - Leica). Finalmente, foi realizada a contracoloração com Hematoxilina de Harris e montagem das lâminas com goma de Damar.

Para controle da qualidade das reações imuno-histoquímicas foram confeccionados blocos de TMA (*tissue microarray*) de controle de acordo com a técnica descrita por Pires *et al.* (2006)⁴⁴, com nove amostras de tecido, três negativas para os marcadores e seis positivas. Para isso, são processadas para imuno-histoquímica, a cada conjunto de 50 amostras, além das amostras que se deseja estudar, uma amostra com e outra sem a adição do anticorpo primário. Os controles chamados de positivos são as que tiveram o processamento completo

(com o anticorpo primário) e os negativos aqueles processados sem o anticorpo primário. Espera-se que a marcação do antígeno seja visível apenas nos controles positivos e não seja visível nos controles negativos.

As especificações dos anticorpos utilizados nas marcações imuno-histoquímicas estão descritas no quadro a seguir:

Quadro 2. Painel de anticorpos utilizados na marcação imuno-histoquímica.

Anticorpo	Especificações	Clone	Fornecedor	Diluição
p16	Monoclonal de camundongo	G175-405	B&D	1/200
Ki-67	Monoclonal de coelho	SP6	Cell Marque	1/100

Todas as técnicas de imuno-histoquímica foram realizadas no DAPC (IFF/Fiocruz).

6.4. Critérios Diagnósticos

A classificação diagnóstica utilizada pelos patologistas foi a de Richart (1967),²⁸ em graus de NIC. Para facilitar a análise, os diagnósticos foram categorizados como no quadro abaixo, em duas ou cinco categorias:

Quadro 3. Categorização dos diagnósticos realizados em HE para efeito de análise.

Grupo diagnóstico		Diagnósticos
NIC 1-	Não NIC	Cervicite
		Endocervicite
		Metaplasia
		Pólipo endocervical
		Reparo/Regeneração
	NIC 1	NIC 1
NIC 2+	NIC 2	NIC 2
	NIC 3	NIC 3
	Carcinoma/ Adenocarcinoma	Adenocarcinoma Carcinoma escamoso
Excluídas	Excluídas	Descritivo*
		Amostra insatisfatória

*Casos com diagnóstico descritivo, nos quais não é possível afirmar um diagnóstico específico.

As reações imuno-histoquímicas foram descritas segundo os parâmetros de espessura do epitélio, distribuição e intensidade de marcação. Quanto à espessura do epitélio, foram classificadas em 1/3 (marcação restrita ao terço profundo do epitélio), 2/3 (marcação restrita aos 2/3 profundos do epitélio) 3/3 (marcação mais extensa que 2/3 do epitélio). Quanto à distribuição, foram classificadas em focal (F), multifocal (MF) e difusa (D). Já a intensidade de marcação predominante foi classificada como negativa (sem nenhuma marcação), fraca, moderada e acentuada.

6.5. Registro dos dados e análise estatística

Todas as informações foram registradas em formulário próprio (Anexo 1) e armazenadas num banco de dados (*Microsoft Office Access* – versão 2010).

Para a avaliação da concordância interobservador foi empregado o coeficiente Kappa de Cohen e de Fleiss, excluindo a concordância ao acaso, com intervalo de confiança de 95%. Foram realizados cálculos considerando cinco

categorias diagnósticas (Não NIC, NIC 1, NIC 2, NIC 3, Carcinoma invasor/adenocarcinoma) ou duas categorias diagnósticas (NIC 1- e NIC 2+) (Quadro 3).

Para avaliar o grau de concordância foi utilizada a classificação proposta por Landis e Koch, na qual valores de Kappa inferiores a zero sugerem nenhuma concordância, entre 0 e 0,2 uma concordância fraca, entre 0,21 a 0,4 razoável, entre 0,41 a 0,6 moderada, entre 0,61 a 0,8 substancial e entre 0,8 e 1,0 excelente⁴⁵. As análises de concordância foram realizadas nos softwares SPSS versão 20.0 e R versão 3.2.0

Foram considerados significantes valores de p iguais ou menores do que 0,05.

6.6. Considerações éticas e financiamento

Este estudo está inserido no projeto “O valor da marcação imunohistoquímica de p16, Ki-67, p21 e ciclina D1 para o diagnóstico das lesões intraepiteliais escamosas do colo uterino” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o protocolo de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 11542213.2.0000.5269 (Anexo 2).

Como as amostras se tratam de espécimes de arquivo, não foi possível obter Termo de Consentimento das pacientes biopsiadas, mas foi obtida autorização do DAPC do IFF/Fiocruz para sua realização. A identidade das pacientes das quais foram obtidos os espécimes histológicos foi mantida em sigilo.

Este estudo foi financiado pelo PIP-2013 sob o registro: IFF-008-FIO-13-3-15 (R\$20.000,00- vide anexo 3) e com recursos provenientes da Capes (Bolsa de mestrado).

7. Resultados

Foram identificadas 489 biópsias de colo uterino no período de janeiro 2006 a setembro 2014 no DAPC-IFF. Desses casos, 402 tinham blocos de parafina disponíveis e foram submetidos à realização das reações imuno-histoquímicas para p16 e Ki-67.

Houve a perda de 23 casos para p16 e de 26 casos para Ki-67 por esgotamento do epitélio nos recortes da reação imuno-histoquímica (Figura7).

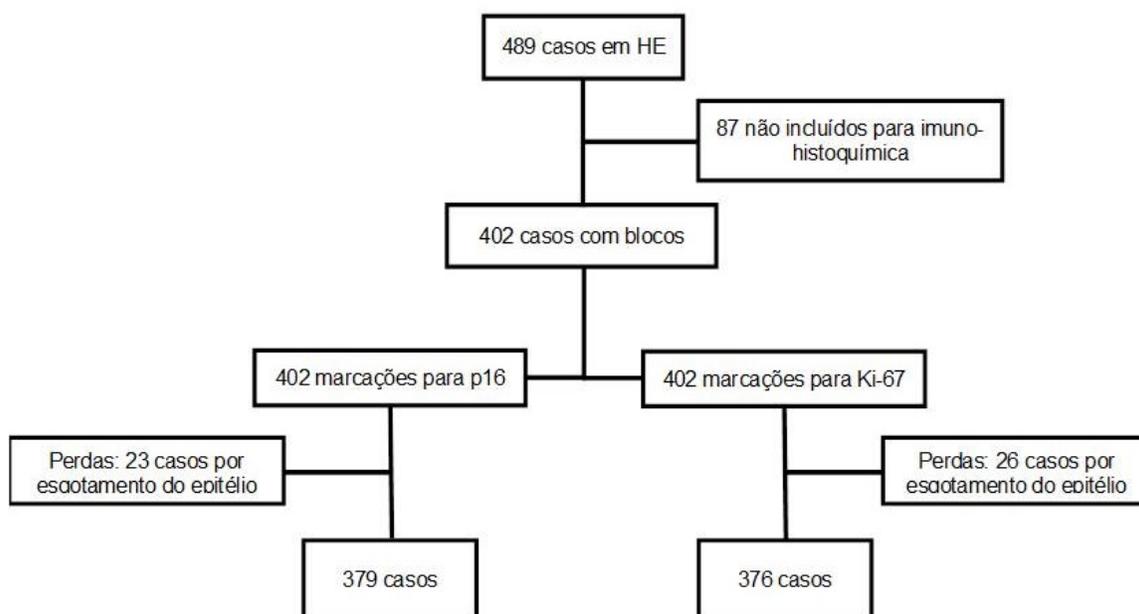


Figura 7. Fluxograma demonstrativo da inclusão e aproveitamento dos casos para análise de concordância diagnóstica.

A distribuição dos diagnósticos de acordo com a avaliação dos patologistas na HE, bem como o resultado do consenso entre eles, contendo a distribuição dos 379 casos incluídos no estudo está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos diagnósticos na HE (IFF/Fiocruz 2006-2014).

Diagnósticos (HE)	Patologista 1 (P1)	Patologista 2 (P2)	Patologista 3 (P3)	Consenso
Não NIC	78 (20.6%)	46 (12.1%)	81 (21.4%)	73 (19.3%)
NIC 1	96 (25.3%)	130 (34.3%)	98 (25.9%)	108 (28.5%)
NIC 2	75 (19.8%)	101 (26.6%)	61 (16.1%)	68 (17.9%)
NIC 3	93 (24.5%)	57 (15.0%)	103 (27.2%)	90 (23.7%)
Carcinoma/Adenocarcinoma	36 (9.5%)	44 (11.6%)	36 (9.5%)	39 (10.3%)
Amostra não diagnóstica	1 (0.3%)	1 (0.3%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)
NIC 1 -	174 (45.9%)	176 (46.4%)	179 (47.2%)	181 (47.8%)
NIC 2 +	204 (53.8%)	202 (53.3%)	200 (52.8%)	197 (52.0%)

Os achados imuno-histoquímicos para as reações de p16 variaram de nenhuma marcação a marcação positiva e difusa com intensidade moderada/acentuada. A distribuição dos parâmetros da avaliação imuno-histoquímica da marcação para p16, obtida pelo consenso entre pelo menos dois patologistas independentes, por diagnóstico de consenso na HE está descrita na Tabela 2, onde quatro casos com diagnóstico de Carcinoma invasor em HE não puderam ser avaliados em relação à marcação do terço do epitélio por serem casos de Adenocarcinoma.

Tabela 2. Parâmetros de marcação de p16 por diagnóstico de consenso na HE.

Parâmetros de marcação p16		Consenso HE				
		Não NIC	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Ca invasor
Terço	^N	68(93,2%)^{§§}	68(63,0%)^{§§}	17(25,0%)	14(15,6%)	1(2,8%)
	^{†1}	5(6,8%)	23(21,3%)	15(22,1%)	2(2,2%)	0(0,0%)
	^{†2}	0(0,0%)	11(10,2%)	29(42,6%)^{§§}	25(27,8%)	3(8,6%)
	^{†3}	0(0,0%)	6(5,6%)	7(10,3%)	49(54,4%)^{§§}	31(88,6%)^{§§}
	Total	73(100,0%)	108(100%)	68(100,0%)	90(100,0%)	35(100,0%)
Distribuição	^N	68(93,2%)^{§§}	68(63,0%)^{§§}	17(25,0%)	14(15,6%)	1(2,6%)
	^{†F}	3(4,1%)	9(8,3%)	4(5,9%)	0(0,0%)	0(0,0%)
	^{§MF}	1(1,4%)	11(10,2%)	15(22,1%)	8(8,8%)	7(17,9%)
	^D	1(1,4%)	20(18,5%)	32(47,1%)^{§§}	68(75,6%)^{§§}	31(79,5%)^{§§}
	Total	73(100,0%)	108(100%)	68(100,0%)	90(100,0%)	39(100,0%)
Intensidade	^N	68(93,2%)^{§§}	68(63,0%)^{§§}	17(25,0%)	14(15,6%)	1(2,6%)
	^{Fr}	3(4,1%)	18(16,6%)	21(30,9%)	16(17,8%)	6(15,4%)
	^{**M}	2(2,7%)	16(14,8%)	24(35,3%)^{§§}	40(44,4%)^{§§}	8(20,5%)
	^{††A}	0(0,0%)	6(5,6%)	6(8,8%)	20(22,2%)	24(61,5%)^{§§}
	Total	73(100,0%)	108(100%)	68(100,0%)	90(100,0%)	39(100,0%)

Observação: ^N: Negativo; ^{†1,2 e 3}: terço do epitélio; ^{†F}: focal. ^{§MF}: multifocal, ^{||D}: difuso; ^{||Fr}: fraco, ^{**M}: moderado, ^{††A}: acentuado. ^{§§}Padrão predominante de cada diagnóstico.

Houve relação significativa entre cada um dos parâmetros de marcação imuno-histoquímica para p16 e o diagnóstico de HE $p < 0,001$, com cinco e duas categorias diagnósticas.

Para identificação do perfil de marcação de p16 mais frequente por categoria diagnóstica, os parâmetros de espessura do epitélio acometido e distribuição foram agrupados e categorizados por diagnóstico no HE, conforme apresentado na Tabela 3.

As marcações negativas ou de positividade focal no terço inferior do epitélio foram mais frequentes nas amostras Não NIC (normal/inflamatório) e de NIC 1. As marcações difusas em 2/3 ou mais do epitélio foram mais frequentes nas amostras de NIC 2, NIC 3 e carcinoma invasor.

Tabela 3. Perfil de marcação imuno-histoquímica de p16 em relação ao consenso de HE em duas e em cinco categorias diagnósticas.

	Consenso HE	Sem marcação	*Dif [†] 1/3	*Dif [‡] 2/3	*Dif [§] 3/3	Outros	Total de casos
NIC 1-	Não NIC	68(93,2%)	1(1,4%)	0(0,0%)	0(0,0%)	4(5,5%)	73 (100,0%)
	NIC 1	69(63,9%)	7(6,5%)	9(8,3%)	4(3,7%)	18(16,7%)	108(100,0%)
NIC 2+	NIC 2	17(25,0%)	3(4,4%)	22(32,4%)	7(10,3%)	19(27,9%)	68(100,0%)
	NIC 3	14(20,6%)	1(1,5%)	21(30,9%)	46(67,6%)	8(11,8%)	90(100,0%)
	Ca invasor	1(2,6%)	0(0,0%)	1(2,6%)	28(71,8%)	9(23,1%)	39(100,0%)

* Dif-difuso, [†]1/3 é restrito ao terço inferior, [‡]2/3-até dois-terços do epitélio, [§]3/3 mais de dois terços do epitélio, ^{||}padrões predominantes.

Tendo em vista os achados acima, definimos a marcação de p16 como positiva se houvesse marcação de pelo menos 2/3 difusa com intensidade de moderada ou acentuada. Os demais padrões de marcação foram considerados negativos. A Tabela 4 apresenta a distribuição da positividade da marcação de p16 em relação ao diagnóstico de consenso de HE.

Tabela 4. Positividade da p16 em relação ao consenso de HE de acordo com o perfil de marcação.

p16	Consenso HE				
	NIC 1-		NIC 2+		
	Não NIC	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Ca invasor
Positivo	0(0,0%)	9(8,3%)	22(32,4%)	56(62,2%)	28(71,8%)
Negativo	73(100,0%)	99(91,7%)	46(67,6%)	34(37,8%)	11(28,2%)
Total	73(100,0%)	108(100,0%)	68(100,0%)	90(100,0%)	39(100,0%)

Utilizando esses critérios para classificação de p16, 100% dos casos diagnosticados como Não NIC foram classificados como negativos, assim como 91,7% dos casos de NIC 1. Os casos de NIC 2 em sua maioria (67,6%) foram negativos para p16. Os casos de NIC 3 e Ca invasor foram positivos para p16 na maioria dos casos. O teste do qui-quadrado evidenciou uma correlação

significativa ($p < 0,001$) entre a classificação da marcação de p16 e o diagnóstico de HE.

A distribuição dos parâmetros de avaliação imuno-histoquímica da marcação para Ki-67, por diagnóstico de consenso na HE está descrita na Tabela 5, onde cinco casos com diagnóstico de Carcinoma invasor em HE não puderam ser avaliados em relação à marcação do terço do epitélio por serem casos de Adenocarcinoma. Foi identificada correlação significativa entre cada um dos parâmetros de marcação e o diagnóstico de HE, avaliado pelo teste estatístico qui-quadrado com significância estatística de $p < 0,001$.

Tabela 5. Parâmetros de marcação de Ki-67 por diagnóstico de consenso na HE.

Parâmetros de marcação Ki-67		Consenso HE				
		Não NIC	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Ca invasor
Terço	[*] N	11(15,1%)	3(2,8%)	1(1,5%)	1(1,1%)	0(0,0%)
	[†] 1	57(78,1%)	87(82,1%)	28(41,2%)	6(6,7%)	0(0%)
	[†] 2	2(2,7%)	12(11,3%)	31(45,6%)	34(37,8%)	0(0%)
	[†] 3	1(1,4%)	4(3,8%)	6(8,8%)	49(54,4%)	34(100,0%)
	[‡] Nd	2(2,7%)	0(0%)	2(2,9%)	0(0%)	0(0%)
	Total	73(100,0%)	106(100%)	68(100,0%)	90(100,0%)	34(100,0%)
Distribuição	[*] N	11(15,1%)	3(2,8%)	1(1,5%)	1(1,1%)	0(0,0%)
	[‡] F	15(20,5%)	18(17,0%)	4(5,9%)	4(4,4%)	0(0%)
	[§] MF	45(61,6%)	80(75,5%)	59(86,8%)	72(80,0%)	25(64,1%)
	D	0(0%)	5(4,7%)	2(2,9%)	13(14,4%)	14(35,9%)
	[‡] Nd	2(2,7%)	0(0%)	2(2,9%)	0(0%)	0(0%)
	Total	73(100,0%)	106(100%)	68(100,0%)	90(100,0%)	39(100,0%)
Intensidade	[*] N	11(15,1%)	3(2,8%)	1(1,5%)	1(1,1%)	0(0,0%)
	[¶] Fr	14(19,2%)	14(13,2%)	7(10,3%)	8(8,9%)	1(2,6%)
	^{**} M	39(53,4%)	59(55,7%)	44(64,7%)	46(51,1%)	18(46,1%)
	^{††} A	7(9,6%)	30(28,3%)	14(20,6%)	35(38,9%)	20(51,3%)
	[‡] Nd	2(2,7%)	0(0%)	2(2,9%)	0(0%)	0(0%)
	Total	73(100,0%)	106(100%)	68(100,0%)	90(100,0%)	39(100,0%)

Observação: ^{*}N: Negativo; [†]1,2 e 3: terço do epitélio; [‡]F: focal. [§]MF: multifocal, ^{||}D: difuso; [¶]Fr: fraco, ^{**}M: moderado, ^{††}A: acentuado; [‡]Nd: Amostra não diagnóstica. ^{§§}Padrão predominante de cada diagnóstico.

As marcações negativas foram mais frequentes nas amostras Não NIC, mas o perfil predominante de marcação encontrado nessa categoria diagnóstica foi marcação até 1/3 multifocal. Esse perfil foi o mais frequente também nas amostras de NIC 1. O perfil multifocal em 2/3 ou mais do epitélio foi mais frequente nas amostras de NIC 2, enquanto que multifocal em 3/3 foi o perfil de marcação mais frequente dos casos de NIC 3 e carcinoma invasor.

Para definirmos um ponto de corte para positividade de Ki-67 agrupamos os resultados dos parâmetros mais comuns de terço e distribuição de marcação de Ki-67 no epitélio, agrupados por categoria diagnóstica do consenso de HE (Tabela 6).

Tabela 6. Perfil de marcação imuno-histoquímico de Ki-67 em relação ao consenso de HE em duas e em cinco categorias diagnósticas.

Consenso HE		Sem marcação	* MF/D †1/3	MF/D ‡2/3	MF/D §3/3	Outros	Total de casos
NIC 1-	Não NIC	11(15,1%)	42(57,5%)	2(2,7%)	1(1,4%)	17(23,3%)	73 (100,0%)
	NIC 1	3(2,8%)	70(66,0%)	12(11,4%)	3(2,8%)	18(17,0%)	106(100,0%)
NIC 2+	NIC 2	1(1,5%)	24(35,3%)	31(45,6%)	6(8,8%)	6(8,8%)	68(100,0%)
	NIC 3	1(1,1%)	3(3,3%)	33(36,7%)	49(54,4)	4(4,4%)	90(100,0%)
	Ca invasor	0(0,0%)	0(0,0%)	0(0,0%)	34(87,2%)	5(12,8%)	39(100,0%)

*MF- multifocal e Dif-difuso, †1/3 é restrito ao terço inferior, ‡2/3-até dois-terços do epitélio, §3/3 mais de dois terços do epitélio, ||padrões predominantes.

Tendo em vista os achados da tabela acima definimos como positivo uma marcação de pelo menos dois terços, com distribuição multifocal ou difusa e intensidade moderada ou acentuada. Foi considerado negativo qualquer outro perfil de marcação. A Tabela 7 apresenta a positividade da marcação de Ki-67 em relação ao consenso de HE.

Tabela 7. Positividade da Ki-67 em relação ao consenso de HE de acordo com o perfil de marcação.

Consenso HE					
Ki-67	NIC 1-		NIC 2+		
	Não NIC	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Ca invasor
Positivo	3(4,1%)	15(14,2%)	35(51,5%)	77(85,6%)	34(87,2%)
Negativo	70(95,9%)	91(85,8%)	33(48,5%)	13(14,4%)	5(12,8%)
Total	73(100,0%)	106(100,0%)	68(100,0%)	90(100,0%)	39(100,0%)

Na Tabela 7 podemos observar que a maioria dos casos Não NIC (95,9%) e NIC 1(85,8%) foram classificados como negativo para Ki-67, enquanto que a maioria dos casos de NIC 3 (85,6%) e Ca invasor (97,4%) foram classificados como positivos. Na categoria de NIC 2, apesar da maioria dos casos ter sido classificada como positivo, um percentual bem semelhante foi classificado como negativo. Foi identificada uma correlação significativa ($p < 0,001$) do diagnóstico com o perfil de marcação para Ki-67.

A Figura 8 ilustra os perfis de imunomarcção mais frequentes para p16 e Ki-67 em relação aos achados de HE.

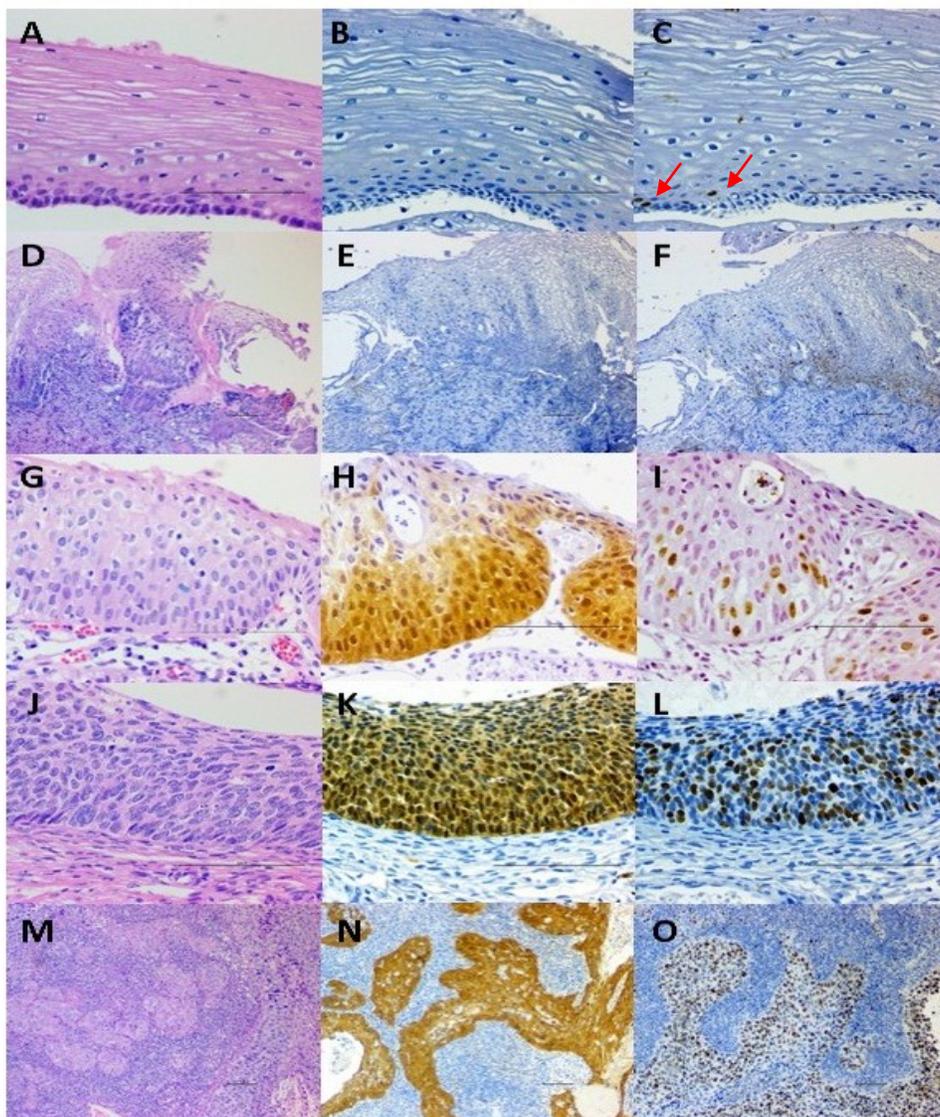


Figura 8. Padrão de marcação mais frequente para p16 e Ki-67 em cada categoria diagnóstica (Não NIC, NIC 1, NIC 2, NIC 3 e Ca invasor) de acordo com o consenso HE. A-C: representam caso diagnosticado como Não NIC, coloração de rotina HE (A-40x), ausência de imunomarcagem para p16 (B-40x) e raros núcleos marcados para Ki-67 (seta,C-40x); D-F: representam caso diagnosticado como NIC 1, HE (D-10x), ausência de imunomarcagem para p16 (E-10x) e presença de positividade difusa para Ki-67 no terço inferior (F-10x); G-I: representam caso diagnosticado como NIC 2, HE (G-40x), imunomarcagem difusa até 2/3 do epitélio para p16 (H-40x) e positividade multifocal em até dois terços do epitélio para Ki-67 (I-40x); J-L: representam caso diagnosticado como NIC 3, HE (J-40x), imunomarcagem difusa 3/3 do epitélio para p16 (K-40x) e marcação multifocal em 3/3 do epitélio para Ki-67 (L-40x); M-O: representam caso diagnosticado como Carcinoma invasor, coloração de rotina HE (M-10x), imunomarcagem difusa para p16 (O-10x) e para Ki-67 (N-10x).

O parâmetro de maior concordância entre os três patologistas em conjunto, na avaliação do p16, foi o de intensidade com uma concordância apenas moderada (Kappa 0,564), enquanto o parâmetro de distribuição foi o de menor concordância (Kappa 0,331, razoável) conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Concordância interobservador não ponderada do perfil de marcação imuno-histoquímico de p16.

Terço	Kappa	Distribuição	Kappa	Intensidade	Kappa	P-valor [†]
[*] P1 vs P2	0,455	P1vs P2	0,288	P1 vs. P2	0,610	p < 0,01
P1 vs P3	0,561	P1vs P3	0,364	P1 vs. P3	0,467	P < 0,01
P2 vs P3	0,449	P2 vs P3	0,343	P2 vs. P3	0,625	P < 0,01
Todos	0,470	Todos	0,331	Todos	0,564	P < 0,01

^{*}P: Patologista; [†]P-valor dos cálculos de Kappa.

O valor de Kappa não ponderado em Ki-67, considerando a concordância entre os três patologistas simultaneamente foi de 0,596 (moderada) para o parâmetro terço, de 0,099 (fraca) para a distribuição e de 0,128 (fraca) para a intensidade da marcação no epitélio (Tabela 9).

Tabela 9. Concordância interobservador não ponderada do perfil de marcação imuno-histoquímico de Ki-67.

Terço	Kappa	Distribuição	Kappa	Intensidade	Kappa	[†] P-valor
[*] P1 vs. P2	0,585	P1 vs. P2	0,086	P1 vs. P2	0,053	P < 0.01
P1 vs. P3	0,604	P1 vs. P3	0,216	P1 vs. P3	0,083	P < 0.01
P2 vs. P3	0,605	P2 vs. P3	0,144	P2 vs. P3	0,430	P < 0.01
Todos	0,596	Todos	0,099	Todos	0,128	P < 0.01

^{*}P: Patologista; [†]P-valor dos cálculos de Kappa.

A concordância diagnóstica na coloração de rotina (HE), não ponderada, entre os patologistas no HE, variou entre 0,467 a 0,579 (moderada), quando foram consideradas todas as cinco categorias diagnósticas (Não NIC, NIC 1, NIC 2, NIC

3 e Carcinoma invasor), e entre 0,694 a 0,773 (substancial), quando considerados apenas duas categorias diagnósticas (NIC 1- e NIC 2+). O valor de Kappa ponderado considerando todas as categorias diagnósticas também foi substancial, variando entre 0,662 a 0,729 (Tabela 10).

Tabela 10. Concordância interobservador não ponderada e ponderada no HE em todas as categorias diagnósticas e nas categorias de gravidade.

Concordância (HE)	Não ponderado		Ponderado	
	Kappa (Todos)	Kappa (†Gravidade)	Kappa (Todos)	Kappa (†Gravidade)
P1 vs. P2	0,467	0,694	0,662	0,696
P1 vs. P3	0,579	0,73	0,729	0,731
P2 vs. P3	0,553	0,773	0,713	0,773
P1 vs. P2 vs. P3	0,53	0,732	---	---
P1 vs. Consenso	0,744	0,821	0,841	0,817
P2 vs. Consenso	0,683	0,842	0,806	0,838
P3 vs. Consenso	0,784	0,863	0,866	0,863
P1 vs. P2 vs. P3 vs. Consenso	0,634	0,787	---	---

*Todos = Não NIC, NIC 1, NIC 2, NIC 3 ou carcinoma invasor / †Gravidade = NIC 1 – ou NIC 2 +

A concordância de cada patologista individualmente com o consenso na HE nas cinco categorias diagnósticas foi de substancial a excelente, com um valor de Kappa não ponderado variando entre 0,683 e 0,784 e um valor de Kappa ponderado variando entre 0,806 e 0,866.

A Tabela 11 apresenta os resultados dos valores de Kappa, ponderado e não ponderado, baseados nos diagnósticos realizados pela análise de p16, variando o não ponderado entre 0,460 e 0,624 (de moderado a substancial), em cinco categorias diagnósticas, e entre 0,763 e 0,842 (de substancial a excelente) em duas categorias diagnósticas. O valor de Kappa ponderado considerando todas as categorias diagnósticas variou entre 0,662 a 0,754 (substancial).

Tabela 11. Concordância interobservador não ponderada e ponderada de p16 em todas as categorias diagnósticas e nas categorias de gravidade.

Concordância (P16)	Não ponderado		Ponderado	
	Kappa (*Todos)	Kappa (†Gravidade)	Kappa (†Todos)	Kappa (†Gravidade)
P1 vs. P2	0,514	0,842	0,662	0,842
P1 vs. P3	0,624	0,826	0,754	0,826
P2 vs. P3	0,460	0,763	0,640	0,764
P1 vs. P2 vs. P3	0,527	0,810	---	---
P1 vs. Consenso p16	0,846	0,952	0,890	0,952
P2 vs. Consenso p16	0,660	0,889	0,765	0,889
P3 vs. Consenso p16	0,782	0,873	0,860	0,873
P1 vs. P2 vs. P3 vs. Consenso p16	0,644	0,857	---	---

*Todos = Não NIC, NIC 1, NIC 2, NIC 3 ou carcinoma invasor / †Gravidade = NIC 1 – ou NIC 2 +

A concordância de cada patologista individualmente com o diagnóstico de consenso de p16, nas cinco categorias diagnósticas, apresentou o valor de Kappa não ponderado variando entre 0,660 e 0,846 (de substancial a excelente), e um valor de Kappa ponderado variando entre 0,765 e 0,890 (substancial a excelente).

Não houve diferença significativa entre a concordância diagnóstica dos três patologistas em conjunto nas cinco categorias diagnósticas, mas houve uma melhora da concordância diagnóstica, de substancial na HE (0,732) para excelente no p16 (0,810) quando utilizado apenas duas categorias diagnósticas (vide Tabelas 10 e 11). Todos os cálculos de valor de Kappa apresentados anteriormente tiveram um P-valor <0,01.

A Tabela 12 apresenta os resultados dos valores de Kappa, ponderado e não ponderado, baseados nos diagnósticos realizados pela análise de Ki-67, variando o não ponderado entre 0,435 e 0,521 (moderado), em 5 categorias diagnósticas, e entre 0,671 e 0,748 (substancial) em duas categorias diagnósticas.

O valor de Kappa ponderado considerando todas as categorias diagnósticas variou entre 0,610 a 0,684 (substancial) e variou entre 0,673 e 0,753 nas categorias de gravidade (duas categorias).

Tabela 12. Concordância interobservador não ponderada e ponderada de Ki-67 em todas as categorias diagnósticas e nas categorias de gravidade.

Concordância (Ki67)	Não ponderado		Ponderado	
	Kappa (*Todos)	Kappa (†Gravidade)	Kappa (*Todos)	Kappa (†Gravidade)
P1 vs. P2	0,455	0,671	0,616	0,673
P1 vs. P3	0,521	0,748	0,684	0,753
P2 vs. P3	0,435	0,723	0,610	0,727
P1 vs. P2 vs. P3	0,466	0,713	---	---
P1 vs. Consenso	0,775	0,848	0,850	0,850
P2 vs. Consenso	0,674	0,818	0,769	0,817
P3 vs. Consenso	0,749	0,902	0,834	0,904
P1 vs. P2 vs. P3 vs. Consenso	0,599	0,784	---	---

*Todos = Não NIC, NIC 1, NIC 2, NIC 3 ou carcinoma invasor / †Gravidade = NIC 1 – ou NIC 2 +

Considerando a concordância de cada patologista individualmente com o diagnóstico de consenso de Ki-67, nas cinco categorias diagnósticas, o valor de Kappa não ponderado variou entre 0,674 e 0,775 (substancial), e o valor de Kappa ponderado variou entre 0,769 e 0,850 (excelente). Todos os cálculos de valor de Kappa apresentados anteriormente tiveram um P-valor <0,01.

Não houve diferença significativa entre a concordância dos três patologistas em conjunto quando consideramos as cinco categorias diagnósticas em HE em relação ao Ki-67. Em duas categorias diagnósticas não houve diferença significativa entre HE e Ki-67 (Kappa: 0,732 e 0,713, respectivamente). Todos os cálculos de valor de Kappa apresentados anteriormente tiveram um P-valor <0,01 (Tabelas 10 e 12).

Os gráficos (Figura 9) ilustram os valores de Kappa não ponderado em cinco categorias diagnósticas, definidas pelo consenso no HE no gráfico **A** (Figura

9-A), pelo consenso de p16 **B** (Figura 9-B) e pelo consenso de Ki-67 no gráfico **C** (Figura 9-C).

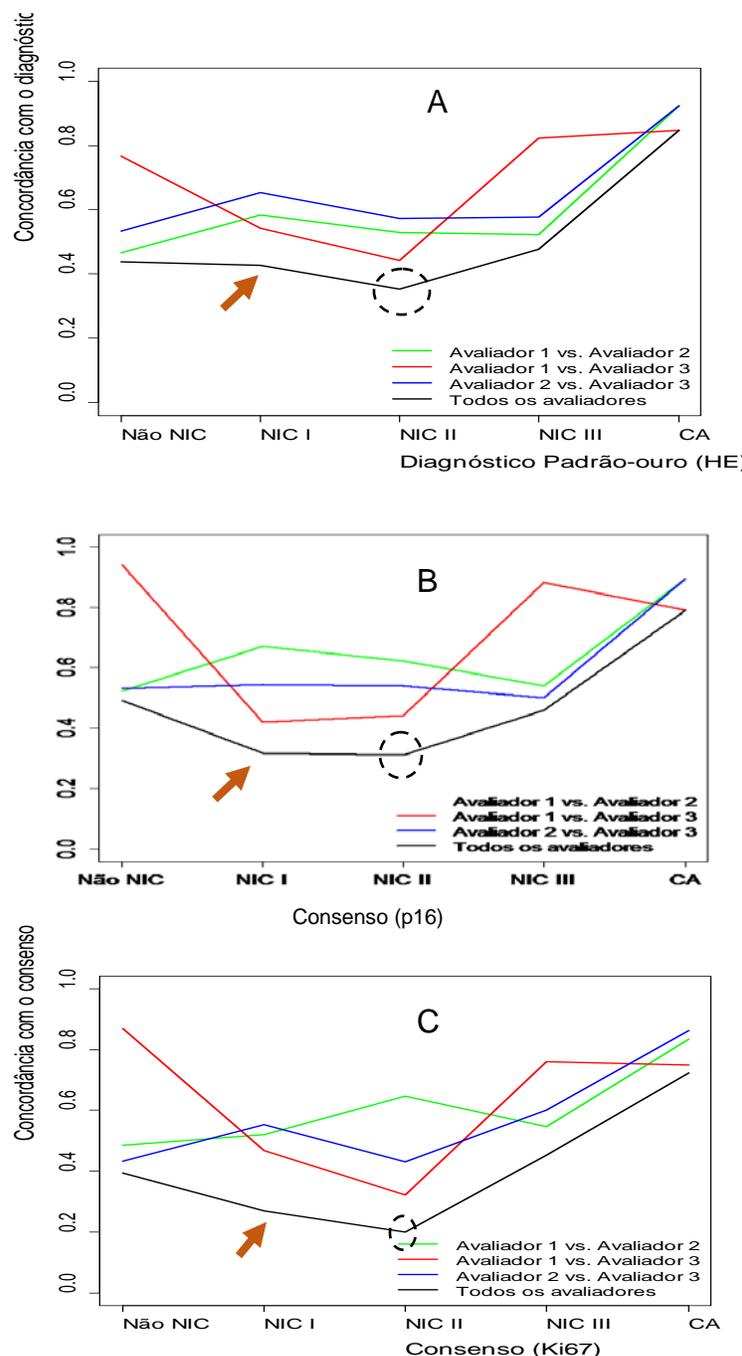


Figura 9. Concordância interobservador (Kappa) por categoria diagnóstica de HE. Gráfico A HE. Gráfico B: p16. Gráfico C: Ki-67. Linha preta valor de Kappa entre os 3 observadores, demais linhas representam o Kappa por pares. Seta marca o valor de Kappa de NIC 1 em HE e p16. O círculo marca o valor de Kappa de NIC 2 em HE, p16 e Ki-67.

Na HE notamos uma concordância diagnóstica de substancial a excelente para carcinoma invasor, de moderada a substancial para Não NIC, NIC 1 e NIC 3, de razoável a moderada para NIC 2 (Figura 9 A). Na avaliação diagnóstica de p16, a concordância diagnóstica teve um padrão semelhante a HE na maioria das categorias diagnósticas, especialmente quando avaliada a linha (preta) representativa da concordância entre os três patologistas. Destaca-se a piora da concordância no diagnóstico na categoria de NIC 1, definida pelo consenso de HE (Figura 9 B).

No gráfico do Ki-67, quando avaliamos a linha representativa da concordância entre as três patologistas houve uma piora na concordância do Não NIC e do NIC 1 em comparação com a HE. Em comparação a p16, o padrão da concordância diagnóstica foi semelhante, porém houve uma piora na concordância das categorias Não NIC (moderada para razoável) (Figura 9C).

As Tabelas 13 e 14 apresentam a correlação entre o diagnóstico de consenso no HE e o diagnóstico de consenso de p16, respectivamente em cinco e em duas categorias diagnósticas.

Tabela 13. Correlação do diagnóstico consenso na HE e diagnóstico de consenso do p16.

HE / P16	Não NIC	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Ca invasor	Total
Não NIC	60(82,2%)	12(16,4%)	1(1,4%)[*]	0(0,0%)	0(0,0%)	73
NIC 1	47(43,5%)	50(46,3%)	9(8,3%)[*]	2(1,9%)[*]	0(0,0%)	108
NIC 2	6(2,9%)[*]	23(33,8%)[*]	31(45,6%)	8(11,8%)	0(0,0%)	68
NIC 3	2(2,2%)[*]	3(3,3%)[*]	20(22,2%)	63(70,0)	2(2,2%)	90
Ca invasor	0(0,0%)	0(0,0%)	0(0,0%)	3(7,7%)	36(92,3%)	39

Casos reclassificados, ^{*}predominam os casos reclassificados.

Tabela 14. Correlação do diagnóstico de consenso na HE e diagnóstico de consenso de p16 na categorização diagnóstica NIC 1 – e NIC 2 +.

HE	P16	NIC 1 -	NIC 2 +	Total
	NIC 1 -		169(44,59%)	12(3,16%)
NIC 2 +		34(8,97%)	163(43%)	197

Na avaliação dessas duas tabelas percebemos 12 casos de NIC 1- (6,62% dos casos NIC 1- na HE; 3,16% de todas as biópsias) que foram classificados como NIC 2+ na avaliação da marcação de p16. A maioria desses casos estavam representados por diagnóstico de NIC 1 na HE que foram reclassificados como NIC 2 na avaliação de p16.

Diversamente, 34 casos (17,25% dos casos NIC 2+ na HE, 8,97% de todas as biópsias) com diagnóstico de NIC 2+ na HE foram classificados como NIC 1- no p16. A maioria desses casos estavam representados por diagnóstico de NIC 2 na HE que foram reclassificados como NIC 1 na avaliação de p16.

As tabelas 15 e 16 apresentam a correlação do diagnóstico do consenso de HE e o diagnóstico de consenso do Ki-67 em cinco e duas categorias, respectivamente.

Tabela 15. Correlação do diagnóstico do consenso de HE e diagnóstico de consenso do Ki-67.

HE /	Ki67	Não NIC	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Ca invasor	Total
Não NIC		51(69,9%)	16(21,9%)	1(1,4%)*	1(1,4%)*	0(0,0%)	73
NIC 1		41(38,7%)	52(49,1%)	8(7,5%)*	5(4,7%)*	0(0,0%)	106
NIC 2		5(7,4%)*	26(38,2%)*	26(38,2%)	9(13,3%)	0(0,0%)	68
NIC 3		2(2,2%)*	2(2,2%)*	30(33,3%)	55(61,1%)	2(2,2%)*	90
Ca invasor		0(0,0%)	0(0,0%)	0(0,0%)	5(12,8%)	34(87,2%)	39

Casos reclassificados, * predominam os casos reclassificados.

Tabela 16. Correlação do diagnóstico de consenso na HE e diagnóstico de consenso de Ki-67 na categorização diagnóstica NIC 1 – e NIC 2 +.

		Ki67	NIC 1 -	NIC 2 +	Total
HE	NIC 1 -		160 (43,13%)	15 (4,04%)	175
	NIC 2 +		35 (9,43%)	161(43,4%)	196

Nas Tabelas 15 e 16 vemos 15 casos (4,04% de todas as biópsias) que foram classificadas como NIC 1- em HE e foram reclassificadas como NIC 2+ na avaliação de Ki-67. A maioria desses casos foram diagnosticados como NIC 1 na HE e reclassificados como NIC 2 no Ki-67.

Diversamente, 35 casos (9,43% de todas as biópsias) com diagnóstico de NIC 2+ na HE foram reclassificados como NIC 1- no Ki-67. A maioria desses casos eram de NIC 2 na HE e foram reclassificados como NIC 1 no Ki-67 (Tabelas 15 e 16).

As tabelas 17 e 18 apresentam a correlação do diagnóstico do consenso de p16 e o diagnóstico de consenso do Ki-67 em cinco e duas categorias, respectivamente.

Tabela 17. Correlação do diagnóstico de consenso do p16 e diagnóstico de consenso do Ki-67.

p16/	Ki-67	Não NIC	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Ca invasor	Total
Não NIC		82(74,5%)	27(24,5%)	1(1,0%)*	0(0,0%)	0(0,0%)	110
NIC 1		15(17,4%)	58(67,4)	7(8,1%)*	6(7,1%)*	0(0,0%)	86
NIC 2		2(3,3%)*	10(16,4%)*	37(60,7%)	12(19,6)	0(0,0%)	61
NIC 3		0(0,0%)	1(1,3%)*	20(26,3%)	52(68,5%)	3(3,9%)	76
Ca invasor		0(0,0%)	0(0,0%)	0(0,0%)	5(13,2%)	33(86,8%)	38

Casos reclassificados, *predominam os casos reclassificados.

Tabela 18. Correlação do diagnóstico de consenso de p16 e diagnóstico de consenso de Ki-67 na categorização diagnóstica NIC 1 – e NIC 2 +.

		Ki-67	NIC 1 -	NIC 2 +	Total
P16	NIC 1 -		182 (49,06%)	14 (3,77%)	196
	NIC 2 +		13 (3,5%)	162 (43,67%)	175

Nas Tabelas 17 e 18 vemos 14 casos (3,77% de todas as biópsias) que foram classificadas como NIC 1- em p16 e foram reclassificadas como NIC 2+ na avaliação de Ki-67. A maioria dos casos de NIC 1 foram reclassificados como NIC 2 no Ki-67.

Diversamente, 13 casos (3,5% de todas as biópsias) com diagnóstico de NIC 2+ no p16 foram classificados como NIC 1- no Ki-67. A maioria dos casos de NIC 2 no p16 que foram reclassificados como NIC 1 no Ki-67 (Tabelas 17 e 18).

8. Discussão

Este estudo visou avaliar a correlação da expressão imuno-histoquímica de p16 e Ki-67 nas diferentes categorias diagnósticas e seu impacto na variabilidade diagnóstica nas biópsias de colo uterino. O DAPC (IFF/Fiocruz) frequentemente recebe amostras de colo uterino, provenientes do setor de Patologia Cervical, e até a implementação deste projeto não realizava avaliação imuno-histoquímica de biópsias do colo uterino.

A distribuição diagnóstica descrita no nosso estudo foi semelhante a estudos prévios que incluíram essas mesmas categorias diagnósticas⁴⁰ e de outros estudos que não incluíram os carcinomas invasores, mas tiveram uma distribuição semelhante nas categorias de NIC^{13,22}. As biópsias de colo uterino são realizadas apenas em pacientes com exame citológico alterado após avaliação colposcópica, o mesmo ocorre com as pacientes encaminhadas para nossa instituição. Por concentrarmos um grupo com maior probabilidade de NIC, nossos patologistas têm muita experiência na avaliação dessas lesões, o que pode não representar a realidade da experiência diagnóstica de outros laboratórios de patologia, conforme discutido mais à frente em relação a interpretação dos dados de reprodutibilidade diagnóstica.

Neste estudo, assim como nos demais que o precederam^{21,46,47}, pudemos observar que o padrão de marcação para p16 e de Ki-67 tinham significativa correlação com o grau da lesão. Observamos que estes marcadores são negativos nas lesões Não NIC e com o aumento da expressão imuno-histoquímica de ambos os marcadores de acordo com o grau da lesão, e que a maioria das

lesões de alto grau são positivas em pelo menos 2/3 do epitélio de forma difusa (p16) ou multifocal (Ki-67). Por esse motivo acreditamos que esses marcadores podem auxiliar na diferenciação entre uma lesão de baixo grau e uma lesão de alto grau assim como descrito na literatura.^{21,23,46}

Apesar da concordância na avaliação dos parâmetros de marcação imunohistoquímica ter sido apenas moderada entre os três avaliadores, como trabalhamos com o consenso de pelo menos dois deles, todos os parâmetros avaliados tiveram correlação significativa com o diagnóstico.

Os pontos de corte para positividade de p16 e Ki-67 deste estudo foram estabelecidos pelos parâmetros de marcação mais frequentes por categoria diagnóstica. Foram características das lesões de alto grau a marcação de pelo menos dois terços, de distribuição difusa e com intensidade moderada ou acentuada para p16 e com marcação de pelo menos dois terços, com distribuição multifocal ou difusa e intensidade moderada ou acentuada para Ki-67.

Os pontos de corte do p16 e Ki-67 pareceram adequados, pois houve predomínio absoluto de negatividade nas amostras de NIC 1- (Não NIC 100% negativos para p16 e 95,9 % para ki-67 e NIC 1 91,7% negativos para p16 e 85,8% para Ki-67). Ocorreu um predomínio de marcação positiva em NIC 3 (p16-62,2%/Ki-67-85,6%) e Carcinoma invasor (p16-71,8%/Ki-67-87,2%).

Na categoria de NIC 2 houve um padrão intermediário com leve predomínio das amostras negativas em p16 e leve predomínio das amostras positivas em Ki-67, o que poderia significar um ponto de corte inadequado ou que essa categoria histológica realmente abriga duas lesões diferentes, uma de baixo grau com grande possibilidade de regressão e outra com características de lesão de alto

grau com maior probabilidade de progressão neoplásica, assim como defende a LAST.²⁴

Esta última hipótese estaria de acordo com os conhecimentos sobre a biologia do HPV e carcinogênese cervical, pois a expressão aumentada desses marcadores está mais relacionada à NIC 3 e carcinoma invasor. O percentual elevado de casos negativos de NIC 2, teoricamente com menor risco de evolução para câncer do que os casos positivos, sugere que seria interessante diferenciar esses casos através desses marcadores. A LAST já incorpora esse fato ao recomendar a utilização de p16 para todos os casos com diagnóstico histológico de NIC 2 e classificá-los como alto ou baixo grau de acordo com esses marcadores.²⁴

A LAST recomenda o uso do ponto de corte de marcação acentuada de pelo menos 1/3 difuso para classificar uma lesão de NIC 2 como alto grau.²⁴ No nosso estudo encontramos 6,5% de casos NIC 1 e apenas 4,4% de casos de NIC 2 com esse padrão de marcação, não nos parecendo haver muita diferença entre o corte da LAST e o adotado por esse estudo para a distinção entre as lesões de alto e baixo grau. Acreditamos serem necessários mais estudos para definir o ponto de corte com melhor acurácia diagnóstica para indicar a evolução clínica dos casos de NIC 2, evitando assim sobretratamentos.

Não há ponto de corte definido para Ki-67 para a distinção dos casos de NIC 2 em lesão de alto e baixo grau, mas como o comportamento da marcação é semelhante ao do p16, talvez pudesse ser utilizado em conjunto ou em substituição ao mesmo, pois o uso do Ki-67 é mais disseminado na rotina diagnóstica e prognóstica de uma série de outras neoplasias. Esse achado

necessita de estudos mais aprofundados, tendo em vista que o uso do Ki-67 não melhorou a reprodutibilidade diagnóstica neste estudo.

A concordância interobservador, na avaliação da HE, em nosso estudo ficou entre moderada e substancial, em cinco e duas categorias diagnósticas, respectivamente. Estes achados são consistentes com estudos semelhantes^{6,12,49}. O grupo de NIC 2 foi o que obteve menor concordância, o que também foi observado em estudo de Cai *et al.* ($\kappa=0.38$) e Palma *et al.* ($\kappa=0.31$). A utilização dos marcadores seria exatamente para tentar melhorar a reprodutibilidade diagnóstica dessa categoria.^{6,7}

O DAPC teve um perfil semelhante na concordância diagnóstica aos descritos em outros estudos^{7,14,49}: o acordo entre os patologistas foi excelente para lesões invasivas, moderadas para NIC 1 e NIC 3 e fraca para NIC 2, baseados somente na avaliação histológica da HE. Já para definir os grupos que necessitam ou não de tratamento (NIC 1- e NIC 2+), a concordância foi substancial (Kappa não ponderado dos 3 patologistas= 0,787).

O uso do p16 melhorou significativamente a concordância diagnóstica, de substancial para excelente (0,787 para 0,810), em duas categorias diagnósticas, o que significa que melhora a reprodutibilidade diagnóstica na definição entre NIC 1- e NIC 2+, por este motivo poderia ser utilizado em caso de dúvida entre lesão de alto grau e seus mimetizadores.

Optamos por utilizar as duas categorias com diagnóstico em NIC 1- e NIC 2+ porque atualmente refletem os grupos de diferentes abordagens terapêuticas. Além disso, o estudo de Palma⁷ observou melhor reprodutibilidade diagnóstica quando NIC 2 ou mais grave em relação a NIC 3 ou mais grave, sugerindo uma

maior dificuldade diagnóstica, na avaliação da HE, entre NIC 2 e NIC 3 do que entre NIC 2 e NIC 1. Este achado ocorreu também em nosso estudo: NIC 2 foi mais frequentemente confundido com NIC 3 e NIC 1 com Não NIC na avaliação independente dos patologistas, o que se reflete em parte no Kappa ponderado das cinco categorias ser semelhante ao Kappa não ponderado de duas categorias diagnósticas.

Tal melhora na concordância diagnóstica não ocorreu quando utilizadas as cinco categorias diagnósticas como em outros estudos¹⁴⁻¹⁸. Provavelmente pelo mesmo motivo exposto acima, pois a marcação imuno-histoquímica de p16 não auxilia no diagnóstico diferencial entre Não NIC e NIC 1 e entre NIC 2 e NIC 3, conforme observado nas tabelas de distribuição dos parâmetros de imuno-histoquímica (Tabelas 2, 3, 5 e 6). Por este motivo não se justifica fazer avaliação imuno-histoquímica de todos os casos, apenas nos casos de dúvida entre lesão de alto grau e seus diferenciais.

O uso do p16 também piorou a reprodutibilidade do diagnóstico de NIC 1 (Figura 9 B), provavelmente pela valorização equivocada da positividade de p16 em casos com morfologia de NIC 1 (8,3%-tabela 4) e que algum patologista reclassificou como NIC 2. O sobrediagnóstico de casos de NIC 1 como HSIL na implementação do uso de p16 também foi referido por Clark *et al.* (2016).⁴¹

No Quadro 4 resumimos estudos com desenho semelhante ao nosso que avaliaram a concordância diagnóstica das biópsias de colo uterino em HE e p16, em cinco categorias diagnósticas com o uso do p16. Podemos observar que três estudos obtiveram significativa melhora da concordância diagnóstica e o nosso e o

de Pacchiarotti ¹⁹ não demonstraram um aumento significativo da concordância diagnóstica nas cinco categorias diagnósticas.

Quadro 4. Variabilidade interobservador em HE e P16

Perfil do estudo				HE		P16	
				5 categorias diagnósticas		5 categorias diagnósticas	
Autor	ano	casos	Nº de patologistas	Não Ponderado	Ponderado	Não Ponderado	Ponderado
Gurrola-Díaz ¹⁴	2008	78	3		0,26 (0,15-0,36)		0,41 (0,34-0,60)
Horn ¹⁷	2008	250	6		0,49 (0,32-0,67)		0,64 (0,54-0,74)
Dijkstra ¹⁶	2010	406	3		0,44 (0,19 - 0,64)	x	0,66 (0,47 - 0,79)
Pacchiarotti ¹⁹	2014	441	5	0,517	x	0,48	x
Nosso estudo	2016	379	3	0,53 (0,46 - 0,58)	0,69 (0,66-0,73)	0,53 (0,46- 0,63)	0,71 (0,66-0,76)x

Ao analisarmos o quadro acima para entendermos o motivo pelo qual não houve melhora na reprodutibilidade com o uso do p16, notamos que os estudos que referiram melhora do Kappa passaram de um Kappa fraco para moderado, ou de moderado para substancial. No nosso estudo o Kappa para cinco categorias diagnósticas no HE já apresentava o valor de Kappa semelhante aos obtidos com o p16 nos demais estudos.

Esse resultado pode ser explicado pelo fato do grupo de examinadores no DAPC do IFF/fiocruz, ser constituído por patologistas com mais de 10 anos de experiência, e que trabalham juntos há pelo menos 7 anos, o que predispõe a uma maior uniformidade dos critérios diagnósticos.

Um estudo muito interessante que vale mencionar é o de Bergeron que também identificou um Kappa de 0,566 em duas categorias diagnósticas e passou para 0,749 após a avaliação de p16.¹³ O Kappa não ponderado do nosso estudo era substancial (0,73) na HE em duas categorias, e a mesma explicação em

relação a tabela anterior cabe em relação a esta situação. O estudo de Bergeron, que avaliou a concordância entre 12 patologistas gerais, tem um poder estatístico bem maior que o nosso estudo e sustenta a hipótese de que a interpretação do p16 resulta numa melhor acurácia diagnóstica das biópsias cervicais. Esses achados devem refletir melhor a realidade da maioria dos laboratórios de patologia que geralmente não dispõe de um grupo tão homogêneo de patologistas como o do DAPC-IFF/Fiocruz.

Ao avaliarmos os gráficos da Figura 9 podemos notar que o uso do marcador impacta de forma diferente nos pares de patologistas nas categorias diagnósticas. A expressão imuno-histoquímica traz informações que modulam de forma diferente para cada patologista o resultado, pois cada patologista carrega o seu próprio viés de avaliação que pode ou não ser melhorado pelo uso da imuno-histoquímica, pois esse método também é observador dependente.

A pouca experiência com avaliação imuno-histoquímica do grupo do DAPC-IFF/Fiocruz não parece ter afetado o resultado, pois os valores de Kappa em p16 deste estudo foram semelhantes ou superiores aos dos estudos apresentados no Quadro 4. Outros estudos^{13,14} também observaram o desempenho de p16 com patologistas que tinham pouca ou nenhuma experiência em avaliar esses marcadores em biópsias de colo uterino.

A meta-análise de Reuschenbach, que incluiu cinco artigos para sua análise, demonstrou que a utilização do p16 em conjunto com o HE levou a um aumento significativo na reprodutibilidade diagnóstica de NIC 2+, por isso eles sugeriram a utilização do p16 apenas em casos de dúvida nos diagnósticos de NIC 2.¹⁸ No nosso estudo a análise do p16 não melhorou a reprodutibilidade

diagnóstica na categoria de NIC 2. Apesar deste achado não sustentar a indicação do uso do p16 nos casos de NIC 2 para melhorar a reprodutibilidade diagnóstica, os demais achados discutidos acima (diferenças de parâmetros de distribuição por categoria diagnóstica e o duplo perfil encontrado em NIC 2) estão de acordo com a sugestão do uso do p16 na categoria diagnóstica de NIC 2 conforme recomendação da LAST.²⁴

Quando fizemos a mesma análise comparando a concordância de HE com Ki-67, o uso deste marcador não melhorou significativamente a concordância diagnóstica, tanto em cinco como em duas categorias, porém não foram encontrados estudos de concordância relacionando o diagnóstico de HE com Ki-67 para realizarmos a comparação desses resultados e podermos avaliar se a falta de melhora está relacionada à experiência diagnóstica do grupo avaliador neste estudo.

A avaliação do Ki-67 foi um pouco mais complicada, pois este marcador também estava expresso em algum grau nas amostras normais, reacionais e de baixo grau, não havendo na literatura pontos de corte bem definidos deste marcador para as diferentes categorias diagnósticas. Os pontos de corte para positividade deste estudo foram definidos após a descrição dos parâmetros imunohistoquímicos, sendo informado aos patologistas apenas as diferentes interpretações dadas à expressão de Ki-67 pelos demais autores.⁵⁰⁻⁵² Como não há consenso de interpretação desse marcador, os critérios para interpretação dos achados no momento da avaliação diagnóstica do Ki-67 foram um pouco mais livres que as do p16, o que poderia explicar em parte a ausência de melhora na concordância diagnóstica na avaliação do Ki-67.

Tendo em vista o claro paralelo que há entre as expressões desses marcadores, p16 e Ki-67, talvez, com a definição de critérios mais claros sobre a interpretação dos achados de Ki-67, este marcador também possa ser útil na distinção das lesões de alto grau dos seus mimetizadores e na definição de quais casos de NIC 2 não necessitariam de abordagem terapêutica.

Neste estudo abordamos apenas a questão da reprodutibilidade[‡], que é apenas um elemento para julgar uma classificação, mas outro aspecto importante seria a validade[§] da utilização desses marcadores na definição de comportamento biológico das NIC 2, que não foi diretamente avaliada por nosso estudo. Ainda restam muitas dúvidas sobre até que ponto NIC 2 corresponde a uma entidade separada do desenvolvimento clínico de HPV para câncer invasivo ou se apenas reflete uma limitação da avaliação histopatológica de separar as lesões com fenótipo morfológico de NIC 2 em lesões de alto e baixo grau.

Atualmente as diretrizes brasileiras sugerem tratamento excisional para a maioria das mulheres com diagnóstico de NIC 2², todavia, os dados deste estudo sugerem que cerca de metade dos casos não parece ser de fato alto grau, merecendo talvez uma abordagem mais conservadora. Claramente a análise histopatológica baseada apenas na coloração de rotina não é capaz de separar esses casos como esses marcadores aparentemente poderiam, mas como nosso estudo não avaliou os desfechos das peças cirúrgicas ou do acompanhamento

[‡] Reprodutibilidade: qualidade que se atribui a um fenômeno quando ele pode ser reproduzido; a reprodutibilidade de uma experiência científica é uma das condições que permitem incluir no processo de progresso do conhecimento científico as observações realizadas durante a experiência. Essa condição origina-se no princípio de que não se pode tirar conclusões senão de um evento bem descrito, que aconteceu várias vezes, provocado por pessoas distintas. Essa condição permite se livrar de efeitos aleatórios que podem afetar os resultados, de erros de julgamento ou de manipulações por parte dos cientistas.

[§] Validade: qualidade ou condição de algo que se encontra em condições de produzir os efeitos dele esperados

clínico dessas pacientes, não é capaz de indicar a validade e a utilidade clínica desses achados.

Para nortear novos estudos que possam avaliar melhor a validade clínica desses marcadores e possíveis classificações derivadas de sua análise, fizemos as comparações dos diagnósticos de consenso com o uso da HE, do p16 e do Ki-67 para avaliar em que percentuais haveriam diferenças de abordagem terapêutica de acordo com o uso desses marcadores.

Ao compararmos os diagnósticos de consenso de HE e de p16 e de HE com Ki-67 (Tabelas 13, 14, 15, 16) evidenciamos que a maioria das discordâncias diagnósticas com impacto clínico foram entre NIC 1 e NIC 2, com maior tendência a sobrediagnosticar NIC 2 na HE em relação aos demais marcadores avaliados.

Maniar *et al.* (2015) também identificaram uma maior tendência da neoplasia intraepitelial (de todo o trato anogenital inferior) grau 2 ser considerada lesão de baixo grau com uso do p16 de acordo com as recomendações da LAST: cerca de um terço dos casos diagnosticados como grau 2 foi reclassificado como baixo grau de acordo com o p16.⁴²

Tanto no nosso estudo como no de Maniar, a consequência clínica mais comum do uso do p16 seria diminuir o tratamento excisional, potencialmente desnecessário, de casos de NIC 2. O que parece ser o mesmo impacto ao compararmos os diagnósticos de consenso do Ki-67 com o da HE.⁴²

Clark *et al.* (2016) identificaram o sobrediagnóstico de HSIL em amostras cervicais na implementação do uso de p16 na avaliação diagnóstica de acordo com as recomendações da LAST, sendo que a maioria desses erros foi ocasionada por avaliação de p16 em amostras com morfologia inequívoca de NIC

1, nos quais a imunomarcação com p16 não deveria ter sido feita, ou por interpretação equivocada do padrão de marcação do p16.⁴¹ O percentual desses achados no nosso estudo, apesar de termos feito em todos os casos, foi muito baixo com ambos os marcadores (3,16% p16 e 4,04% Ki-67), provavelmente por termos utilizado o diagnóstico de consenso ou pelo perfil de experiência do grupo avaliador nesse estudo.

A LAST não recomenda o uso do p16 para lesões de baixo grau, pois ainda não há evidência científica suficiente que justifique seu uso como um marcador progn stico²⁴. Apesar da sabida variabilidade diagnóstica, a classificação atual se correlaciona bem com a evolução clínica das pacientes²⁵ e as limita es da classificação foram levadas em conta na constru o dos programas de rastreio.²

A comparação entre os diagnósticos de consenso de p16 e Ki-67 mostrou um menor percentual de mudança (7,27% dos casos) em rela o   indica o terapêutica, mas os percentuais sobre tratamento que teriam sido equivocados para mais e para menos foram muito semelhantes (tabela 18). Como não há dados na literatura sobre como os achados de Ki-67 deveriam modular a avalia o de NIC 2, seria interessante aprofundar avalia o de ambos os marcadores em rela o ao acompanhamento clínico e entender qual a diferença que pode existir entre os dois e se de fato refletem comportamentos biológicos diferentes dentro dessa categoria diagnóstica.

O diagnóstico histológico depende da subjetividade da avalia o do patologista. A imuno-histoquímica funciona como uma ferramenta adicional para a análise das biópsias, porém ainda   subjetiva por depender da experiência do patologista e de critérios pré-estabelecidos para avalia o.

Muitos estudos diagnósticos em anatomia patológica não tem uma medida objetiva do que seria uma verdade clínica, pois geralmente interrompemos a história natural da doença com tratamentos. É fundamental para melhor compreensão do significado da expressão desses marcadores imuno-histoquímicos e correta utilização clínica dos mesmos, a realização de estudos que correlacionem a expressão desses marcadores com a evolução clínica da paciente ou padrão-ouro diagnóstico que se aproxime mais da realidade da evolução ou estado da doença.

Esses marcadores parecem promissores para estratificar os casos de NIC 2 diferenciando os que deveriam ser tratados e quais poderiam ser acompanhados.

9. Conclusão

O padrão de imunomarcção de p16 e Ki-67 teve relação com as categorias diagnósticas de NIC realizadas em HE, tendendo a ser positivo e difuso em mais de 1/3 do epitélio para p16 e positivo difuso ou multifocal em pelo menos 1/3 do epitélio para Ki-67 nas lesões de alto grau (NIC 2 e NIC 3) e câncer. A ausência de marcação foi mais frequente nos casos de Não NIC e NIC 1.

Houve correlação significativa dos parâmetros de avaliação da marcação imuno-histoquímica de p16 e Ki-67 com a categoria diagnóstica em HE, apesar da concordância interobservador variar de fraca a moderada em cada parâmetro.

Os padrões de marcação para p16 e Ki-67 não auxiliaram na diferenciação entre NIC 2 e NIC 3 assim como também não auxiliaram na distinção entre NIC 1 e Não NIC. Mas ambos os marcadores podem ser úteis na distinção de casos de dúvida entre lesão de alto grau e lesões mimetizadoras de alto grau.

O uso do p16 melhorou a reprodutibilidade diagnóstica quando o objetivo foi separar as lesões de alto grau e câncer (NIC 2+) das lesões de baixo grau e Não NIC (NIC 1-), devendo ser utilizado em casos onde essa seja a dúvida no diagnóstico diferencial.

O uso do Ki-67 não melhorou a reprodutibilidade diagnóstica, por isso não deveria ser indicado para utilização na rotina diagnóstica de análise das biópsias do colo uterino, mas este dado não invalida sua utilização em casos de dúvida entre lesão de alto grau e seus mimetizadores.

A categoria diagnóstica de NIC 2 exibiu um perfil intermediário de expressão de p16 e Ki-67 entre o padrão de não NIC e NIC 1 e o padrão de NIC 3

e carcinoma invasor. Este achado apesar de sugerir a utilidade desses marcadores na distinção do NIC 2 em lesão de baixo ou alto grau, ainda carece da complementação de outros estudos para avaliar a relevância clínica dessa utilização.

O impacto clínico mais observado com a utilização desses marcadores foi a reclassificação de NIC 2+ para NIC 1-, sendo duas vezes mais comum que o oposto.

Referências Bibliográficas**

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2015 [citado em 2015, novembro 30]. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/estimativa_incidencia_cancer_2016.

2. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.

3. Termini L, Villa LL. Biomarcadores Na Triagem Do Câncer Do Colo Uterino. DST – J bras Doenças Sex Transm 2008; 20(2): 125-131.

4. Pinho AA, Mattos MCFI. Validade da citologia cervicovaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo de útero. J bras patol med lab.2002;38(3):225-3.

5. Lapin GA, Derchain SFM, Tambascia J. Comparação entre a colpocitologia oncológica de encaminhamento e a da gravidade das lesões cervicais intraepiteliais. Ver Saúde Públ. 2000;34(2):120-5.

6. Cai B, Ronnett BM, Stoler M, Ferenczy A, Kurman RJ, Sadow D, et al. Longitudinal evaluation of interobserver and intraobserver agreement of cervical intraepithelial neoplasia diagnosis among an experienced panel of gynecologic pathologists. The American journal of surgical pathology. LWW; 2007;31(12):1854–1860.

7. Palma PD, Rossi PG, Collina G, Buccoliero AM, Ghiringhello B, Gilioli E, et al. The Reproducibility of CIN Diagnoses Among Different Pathologists: Data From Histology Reviews From a Multicenter Randomized Study. American journal of clinical pathology. American Society for Clinical Pathology; 2009;132(1):125–132.

8. Massad LS, Jeronimo J, Katki HA, Schiffman M. The accuracy of colposcopic grading for detection of high grade cervical intraepithelial neoplasia. Journal of lower genital tract disease. NIH Public Access; 2009;13(3):137.

9. McCluggage W, Walsh M, Thornton C, Hamilton P, Caughley L, Bharucha H, et al. Inter-and intra-observer variation in the histopathological reporting of

** As normas para elaboração das referências seguem as adotadas pelos programas de pós-graduação do IFP

cervical squamous in traepithelial lesion susing a modified Bethesda grading system. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. Wiley Online Library; 1998; 105(2): 206–210.

10. McCluggage W, Bharucha H, Caughley L M, Date A, Hamilton P W, Thornton C M, Walsh M Y. Interobserver variation in the reporting of cervical colposcopic biopsy specimens: comparison of grading systems. *J Clin Pathol* 1996; 49: 833-835.

11. Ferreira AL. Avaliação da Reprodutibilidade Diagnóstica das Biópsias de Colo Uterino do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira [Trabalho de Conclusão de Curso]. Rio de Janeiro: Centro Universitário Hermínio da Silveira-IBMR-Laureate International Universities, Curso de Biomedicina; 2015.

12. Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M. The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnoses: an ALTS report. *Am J Clin Pathol*. 2007; 127 (5):805-15.

13. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. p16INK4a Testing Significantly Increases Accuracy in Diagnosing High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2010; 133:395- 406.

14. Gurrola-Díaz CM, Suárez-Rincón AE, Vázquez-Camacho G, Buonocunto-Vázquez G, Rosales-Quintana S, Wentzensen N, Doeberitz M. K. P16INK4a immunohistochemistry improves the reproducibility of the histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia in cone biopsies. *Gynecol Oncol*. 2008 Oct;111(1): 120-4.

15. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *The American journal of surgical pathology*. LWW; 2002; 26(11): 1389–1399.

16. Dijkstra MG, Heideman DAM, Roy SC, Rozendaal L, et al. p16INK4a immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions. *J Clin Pathol* 2010; 63: 972 e 977.

17. Horn LC, Reichert A, Oster A, Arndal SF, Trunk, MJ. Immunostaining for p16INK4a Used as a Conjunctive Tool Improves Interobserver Agreement of the Histologic Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 502–512.

18. Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, Doeberitz MVK, Arbyn M. p16^{INK4a} Immunohistochemistry in Cervical Biopsy Specimens: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Interobserver Agreement. *Am J Clin Pathol* 2014; 142:767- 772.

19. Pacchiarotti A, Galeotti S, Bellardini P, Chini F, Collina G, others. Impact of p16INK4a Immunohistochemistry Staining on Interobserver Agreement on the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2014; 141:367-373.

20. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. Ki-67, cyclin E, and p16 INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *The American journal of surgical pathology*. LWW; 2001;25(7):884–891.

21. Niekerk DV, Guillaud M, Maticic J, Benedet JL, Freeberg A, Follen M, MacAulay C. p16 and MIB1 improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of high grade squamous intraepithelial lesions: Methodological issues in a report of 447 biopsies with consensus diagnosis and HPV HCII testing. *Gynecologic Oncology* 107(2007) S233–S240.

22. Aslani FS, Safaei A, Pourjabali M, Momtahan M. Evaluation of Ki67, p16 and CK17 Markers in Differentiating Cervical Intraepithelial Neoplasia and Benign Lesions. *Iran J Med Sci* March 2013; Vol 38 No 1.

23. Melo FL, Lancellotti CL, Silva MA. Expression of the Immunohistochemical Markers p16 and Ki-67 and Their Usefulness in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasms. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2016 Feb; 38(2):82-7.

24. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendations From the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, Volume 16, Number 3, 2012, 205Y242.

25. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents: A Review of Human Carcinogens Vol 100B. Lyon, France: IARC Press; 2012.

26. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses Vol.90. Lyon, France: IARC Press; 2007.

27. Senba M, Mori N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncology Reviews* 2012; 6:e17.

28. IARC Working Group on the Evaluation of Cancer Preventive Strategies. Cervix Cancer Screening: IARC Handbooks of Cancer Prevention No.10. Lyon, France: IARC Press; 2005.

29. Richart, RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 75:131-3, 1990.

30. Sellors, JW; Sankaranarayanan, R. *Colposcopia e tratamento da neoplasia intraepitelial cervical: manual para principiantes* Lyon: Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, 2004.

31. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Patologia Básica*. Edição: 9. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

32. Derchain SFM, Longatto Filho A, Syrjanen KJ. Neoplasia intraepitelial cervical: diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Ginecol Obstet. SciELO Brasil;* 2005;27(7):425-33.

33. Castle PE, Gage JC, Wheeler CM, Schiffman M. The clinical meaning of a cervical intraepithelial neoplasia grade 1 biopsy. *Obstet Gynecol.* 2011 Dec; 118(6):1222-9.

34. Abras AK, Fausto N, Kumar V, Cotran RS, Aster JC, Robbins SL. *Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

35. Stoler MH, Ronnett BM, Joste NE, Hunt WC, Cuzick J, Wheeler CM; New Mexico HPV Pap Registry Steering Committee. The Interpretive Variability of Cervical Biopsies and Its Relationship to HPV Status. *Am J Surg Pathol* 2015; 39 (6):729-36.

36. Bruinsma FJ, Quinn MA. The risk of preterm birth following treatment for precancerous changes in the cervix: a systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 2011; 118(9):1031-1041.

37. Silva-Filho AL, Bruno BN, Silva LB, Traiman P, Castro e Silva JG, Triginelli SA. Associação entre a expressão das proteínas p53 e Ki-67 e os achados clínico-patológicos em pacientes com carcinoma invasor do colo uterino. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005; 27(5): 243-7.

38. Capelozzi VL, Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. *J. bras. pneumol.* vol.35 no.4 São Paulo Apr. 2009.

39. Muniz A, Correa C. *Patologia gástrica* [internet]. Porto: Universidade do Porto; 2009 [citado em: 2010 março 07] Disponível em: <https://pt.slideshare.net/claudiapintocorreia/patologia-gstricaAna Muniz>

40. Vieira RAMAR, Minicucci EM, Marques MEA, Marques AS. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. *An Bras Dermatol.* 2012;87(1):105-14.

41. Clark JL, Lu D, Kalir T, Liu Y. Overdiagnosis of HSIL on cervical biopsy: errors in p16 immunohistochemistry implementation. *Human Pathology* (2016) 55, 51–56.
42. Maniar KP, Sanchez B, Paintal A, Gursel DB, Nayar R. Role of the Biomarker p16 in Downgrading -IN 2 Diagnoses and Predicting Higher-grade Lesions. *Am J Surg Pathol* 2015; 39: 1708–1718.
43. Kanthiya K, Khunnarong J, Tangjitgamol S, Puripat N, Tanvanich S. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 17, 2016.
44. Pires A C; Adreiuolo F M; Souza S R. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diag Pathol* 2006 25;1-14.
45. Landis J.; Koch G. The measurements of agreement for categorical data. *Biometrics*, v.33, n.3, p.159-179, 1977.
46. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang SH, Lee SY, Jang SY, Kim SW, Kim JH, Kim YT, Kim S, Kim JW. Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol* vol 19, N°3:162-168, September 2008.
47. Zhong P, Li J, Gu Y, Liu Y, Wang A, Sun Y, Lu L. P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(3):2979-2986.
48. Queiroz C, Silva TC, Alves VAF, Villa LL, Costa MC, Tavassos AG, Araújo Filho JB, Studart E, Cheto T, Freitas LAR. Comparative study of the expression cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathology-Research and Practice* 2006; 202: 731-737.
49. Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, Eakins D, Evans DMD, Gradwell E, O'Sullivan JP, Summerell JM, Newcombe RG. Observer variation in histopathological diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 1989; 298: 707-10.
50. Malpica A, Deavers MT, Euscher E. *Biopsy Interpretation of the Uterine Cervix and Corpus*. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2010(26).
51. Crum CP, Nucci MR, Lee KR. *Diagnostic gynecologic and obstetric pathology*. Edição: 2. Philadelphia: Elsevier, 2011(287-292).
52. Robboy SJ, Mutter GL, Prat J, Bentley RC, Russell P, Anderson CM. *Robboy's Pathology of the Female Reproductive Tract*. Edição: 2. Printed in China. Editora: Elsevier, 2009(208-210).

Anexo 2.**Parecer Consubstanciado do CEP**

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

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

Pesquisador: Cecília Vianna de Andrade **Área Temática:**

Versão: 1

CAAE: 11542213.2.0000.5269

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

Patrocinador Principal: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO
ESTADO DO RIO DE
JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer:

258.124 **Data da**

Relatoria:

28/03/2013

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

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

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



Pesquisa de interesse da Instituição com incorporação de novas tecnologias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados em conformidade todos os termos obrigatórios.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendencia ou inadequação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 28 de Abril de 2013

**Assinador por:
mariaelisabethlo
pesomeira
(Coordenador)**

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail:

Anexo 3.

Orçamento do projeto submetido para captação de fomento em 2013:

Imuno			
Materiais de consumo		Materiais permanentes	
Ki-67	R\$ 2.805,05	Destilador	R\$ 700,00
p16	R\$ 2.275,00	Banho-maria	R\$ 735,00
p21	R\$ 2.500,00	Total	R\$ 1.435,00
ciclina D1	R\$ 2.387,00		
trilogy	R\$ 566,00		
KitMach 4	R\$ 3.400,00		
Kit Dab 100ml	R\$ 532,00		
Peroxido de hidrogenio	R\$ 22,00		
alcool metílico	R\$ 6,00		
hidróxido da amonia	R\$ 14,00		
Tween	R\$ 151,00		
Detertec pH	R\$ 35,00		
ponteiras 0-10ul	R\$ 11,93		
ponteiras 0-1000ul	R\$ 13,44		
ponteiras 0 -200	R\$ 13,77		
microtubo criogenio	R\$ 95,88		
Acetona	R\$ 31,00		
lâmina silanizada (5 caixas de 50 lâminas)	R\$ 250,00		
Cloreto de sódio	R\$ 15,00		
fosfato de sódio monobásico	R\$ 41,00		
fosfato dibásico	R\$ 27,00		
hidroxido de sódio	R\$ 47,00		
Total	R\$ 15.239,07		