

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Ana Carolini da Rosa Malagoli

**Marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67 como adjuvantes no diagnóstico do câncer
do colo do útero: revisão narrativa da literatura**

Florianópolis

2022

Ana Carolini da Rosa Malagoli

**Marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67 como adjuvantes no diagnóstico do câncer
do colo do útero: revisão narrativa da literatura**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em
Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Santa Catarina como requisito
para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabiana Botelho de Miranda
Onofre

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca Universitária da UFSC.

Malagoli, Ana Carolini

Marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67 como adjuvantes
no diagnóstico do câncer do colo do útero : revisão
narrativa da literatura / Ana Carolini Malagoli ;
orientador, Fabiana Botelho de Miranda Onofre, 2022.
44 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. coloração dupla p16/Ki-67. 3. Câncer do
colo do útero. 4. Papilomavírus humano. I. Onofre, Fabiana
Botelho de Miranda . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Ana Carolini da Rosa Malagoli

Marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67 como adjuvantes no diagnóstico do câncer do colo do útero: revisão narrativa da literatura

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Farmacêutico” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Farmácia

Florianópolis, 15 de março de 2022.

Profª Drª Liliete Canes de Souza
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Profª Drª Fabiana Botelho de Miranda Onofre
Orientador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco
Avaliador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcos José Machado
Avaliador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, por todo apoio, amor e incentivo que sempre me deram. Obrigada do fundo do meu coração, sem vocês nada seria possível;

Aos meus amigos, que eu já conhecia e aos que fiz durante a graduação, cada um de vocês foi muito importante para minha trajetória;

À Professora Fabiana, obrigada por ter aceitado ser minha orientadora, pelas horas dedicadas à realização deste trabalho e por todo o apoio;

Aos membros da banca, por terem aceitado esse convite e pela contribuição feita a este trabalho;

Por fim, a Universidade Federal de Santa Catarina e todos os seus professores, por proporcionar ensino público, gratuito e de excelência.

RESUMO

O câncer do colo do útero (CCU) está relacionado à infecção persistente por tipos oncogênicos do Papilomavírus Humano (HPV), é uma das neoplasias malignas mais frequentes na população feminina no mundo. O diagnóstico preciso das lesões precursoras do CCU se mantém um desafio. O exame de Papanicolaou ainda é o método mais utilizado no Brasil e no mundo, mas apresenta limitações, como menor sensibilidade quando comparado ao teste de HPV. Contudo, o teste de HPV apresenta menor especificidade quando comparado ao Papanicolaou, acarretando em mais mulheres sendo encaminhadas para colposcopia, o que causa danos potenciais como o sobrediagnóstico e tratamento excessivo. Dessa forma, testes de triagem eficazes são fundamentais para identificar mulheres que possuem alto risco de desenvolver CCU, as quais deverão ser encaminhadas para colposcopia. O presente estudo revisou e discutiu, através de uma revisão narrativa da literatura, a coloração dupla dos marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67 como adjuvantes no diagnóstico do câncer do colo do útero. Foram realizadas buscas na base de dados Pubmed. Através desse trabalho, pode se concluir que uso dos marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67 apresentaram ter alta especificidade quando comparada com o teste de HPV, e sensibilidade comparável ou aumentada em comparação ao teste citológico, assim apresentando ser um teste promissor na detecção de lesões pré-cancerosas do colo do útero e câncer do colo do útero.

Palavras-chave: Coloração dupla p16/Ki-67. Câncer do colo do útero. Papilomavírus humano.

ABSTRACT

Immunocytochemical markers p16 and Ki-67 as adjuvants in the diagnosis of cervical cancer: narrative review of the literature

Cervical cancer is related to persistent infection by oncogenic types of Human Papillomavirus (HPV), it is one of the most frequent malignant neoplasms in the female population in the world. Accurate diagnosis of cervical cancer precursor lesions remains a challenge. The Pap smear is still the most used method in Brazil and in the world, but it has limitations, such as lower sensitivity when compared to the HPV test. However, the HPV test has lower specificity when compared to the Pap smear, resulting in more women being referred for colposcopy, which causes potential harm for example overdiagnosis and overtreatment. Hence, effective screening tests are essential to identify women who are at high risk of developing cervical cancer, who should be referred for colposcopy. The present study reviewed and discussed, through a narrative review of the literature, the dual staining of immunocytochemical markers p16 and Ki-67 as adjuvants in the diagnosis of cervical cancer. Searches were performed in the Pubmed database. Through this work, it can be concluded that the use of immunocytochemical markers p16 and Ki-67 showed high specificity when compared to the HPV test, and comparable or increased sensitivity compared to the cytological test, thus showing to be a promising test in the detection of lesions precancerous and cervical cancer.

Keywords: p16/Ki-67 dual staining. Cervical cancer. Human papillomavirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução do epitélio normal até o câncer invasivo	19
Figura 2 – Progressão do Câncer do Colo do Útero	19
Figura 3 – Taxas de mortalidade por câncer do colo do útero. Brasil e regiões, 1980 a 2019	21
Figura 4 – Idade e história natural do câncer do colo do útero	23
Figura 5 – Aumento da expressão de p16 na infecção por HPV	26
Figura 6 – Células com características morfológicas de HSIL	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Fatores que influenciam o desenvolvimento do câncer do colo do útero

22

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Taxa de positividade para o teste de coloração dupla p16/Ki-67 30
- Tabela 2 – Valores da coloração dupla comparado com o teste de citologia e o teste de HPV32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASCCP	<i>American Society for Colposcopy and Cervical Pathology</i>
ASCUS	Células atípicas de significado indeterminado
CCU	Câncer do colo do útero
CD	Coloração dupla p16/Ki-67
CDK	Quinases dependentes de ciclina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau
IST	Infecções sexualmente transmissíveis
INCA	Instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva
LCR	<i>Long control region</i>
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
pRb	Proteína retinoblastoma
SUS	Sistema Único de Saúde
URR	<i>Upstream regulatory region</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 METODOLOGIA.....	17
3.1 MÉTODOS DE BUSCA DOS ESTUDOS NA LITERATURA.....	17
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	17
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
4.1 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.....	18
4.2 EPIDEMIOLOGIA.....	20
4.3 FATORES DE RISCO.....	21
4.4 RASTREAMENTO.....	23
4.5 MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS.....	25
4.5.1 Marcador p16.....	25
4.5.2 Marcador Ki-67.....	27
4.5.3 Citologia de coloração dupla p16/Ki-67.....	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5.1 ANÁLISE E SELEÇÃO DOS ARTIGOS.....	29
5.2 INDICAÇÃO DA COLORAÇÃO DUPLA P16/KI67.....	29
5.3 EFICIÊNCIA DA COLORAÇÃO DUPLA P16/KI-67 PARA IDENTIFICAR AS LESÕES DE ALTO GRAU DENTRE AS LESÕES DE BAIXO GRAU....	30
5.4 SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E VALORES PREDITIVOS POSITIVO E NEGATIVO DA COLORAÇÃO DUPLA P16/KI-67.....	32
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero (CCU) está relacionado à infecção persistente por tipos oncogênicos do Papilomavírus Humano (HPV) e é caracterizado pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do colo uterino, o que causa o desenvolvimento progressivo de lesões cervicais precursoras. (INCA, 2021a; OLUSOLA *et al.*, 2019). Essas lesões se apresentam em graus evolutivos e podem ser classificadas em neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de graus I, II e III (INCA, 2000).

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo (VENKATESULU; MALLICK; RATH, 2017). São registrados aproximadamente 570 mil novos casos por ano no mundo, sendo o CCU responsável por 311 mil óbitos por ano (INCA, 2021).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que no Brasil para cada triênio 2020-2022 sejam esperados 16.590 novos casos de CCU, com um risco aproximado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres. É o terceiro tipo de câncer com maior incidência e a quarta de mortalidade em mulheres no país. Dado que o pico da incidência ocorre na faixa etária de 45 a 50 anos, sendo considerado raro em mulheres de até 30 anos. (INCA, 2019a; INCA, 2021).

Um dos principais fatores causadores do desenvolvimento do CCU é a infecção persistente pelo HPV, vírus frequentemente transmitido através de relações sexuais vaginais e anais, a transmissão também pode ocorrer por contato oral-genital ou genital-genital. Sendo, uma das infecções sexualmente transmissíveis (IST) mais prevalentes em todo o mundo (CUNHA *et al.*, 2020; OLUSOLA *et al.*, 2019; DUNNE *et al.*, 2013).

É um fator necessário para o desenvolvimento do CCU, mas não suficiente. Para o desenvolvimento da neoplasia em questão, é preciso que ocorra uma infecção persistente por um tipo oncogênico, além da influência de outros fatores como a idade, tabagismo e uso de anticoncepcionais orais para que assim possa iniciar as alterações celulares (INCA, 2021c).

Com base em dados de sequenciamento do Ácido desoxirribonucléico (DNA), 216 tipos de HPV já foram reconhecidos, identificados e categorizados como tipos baixo, médio e alto risco (BURD, 2003; OLUSOLA *et al.*, 2019). Os tipos 16 e 18, caracterizados como HPV de alto risco, estão presentes em 70% dos casos do câncer do colo do útero, uma vez que existem pelo menos 13 tipos de HPV considerados oncogênicos, ou seja, possuem maior risco de provocar infecções persistentes e estar associados a lesões precursoras (INCA, 2021b).

O tipo 16 é considerado um precursor do câncer cervical, pois é responsável pela maioria das neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau (NIC II e III) na zona de transformação. O HPV-18 está associado a adenocarcinomas, sendo o mais raro e menos encontrado nas células glandulares presentes no canal endocervical (WUERTHNER; AVILA-WALLACE, 2016).

Por muitos anos o exame de Papanicolaou tem sido a principal ferramenta de rastreamento do CCU no mundo contribuindo para a redução da doença em mulheres com idade entre 35 a 64 anos em pelo menos 80% (MAGKANA *et al.*, 2021). Reduziu também, além da incidência, a taxa de mortalidade por câncer cervical em países desenvolvidos com programas de rastreamento organizados (VARGAS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015). A introdução das vacinas contra o HPV também ajudaram as taxas de CCU a diminuir cerca de 1% a 1,9% ao ano (JOHNSON *et al.*, 2019).

A estratégia empregada para o rastreamento do CCU no Brasil é através do exame de Papanicolaou. Recomenda-se que o exame seja oferecido a mulheres sexualmente ativas dos 25 aos 64 anos, e caso ocorram dois testes negativos em anos consecutivos, é aconselhado um intervalo de três anos para a realização do próximo teste. Isso porque, antes dos 25 anos, as infecções por HPV e lesões de baixo grau na maioria dos casos regridem espontaneamente, então o rastreamento nesse grupo pode acarretar em sobrediagnóstico e sobretratamento (SILVA *et al.*, 2017a; INCA 2021c).

A Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical (ASCCP - *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*) estabeleceu que a utilização do teste de HPV em mulheres acima de 25 anos é preferível em relação à repetição da citologia. A ASCCP também aprovou três abordagens de rastreamento do CCU para mulheres entre 21 a 65 anos: citologia, teste de DNA do HPV de alto risco e o co-teste (citologia mais o teste de HPV). Contudo, essas propostas implicam em uso de tecnologia não disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) (MAGKANA *et al.*, 2021; INCA, 2016).

Estudos apontam que o teste Papanicolaou apresenta sensibilidade menor, quando comparada ao teste do HPV, o qual é mais sensível, mas menos específico quando comparado ao Papanicolaou para detectar NIC II e III. Visto isso, o teste de HPV está sendo incorporado ao rastreamento cervical para melhorar a prevenção do CCU em um número crescente de países. No entanto, muitas infecções regridem sem desenvolver lesões de alto grau, assim o

número de pacientes encaminhados para colposcopia aumenta. (JOHNSON *et al.*, 2019; CAROZZI *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2021; MAGKANA *et al.*, 2021).

Encaminhar todas as mulheres HPV-positivas para colposcopia não é viável, pois pode levar a danos potenciais, como sobrediagnóstico e tratamento excessivo. Assim, estratégias de triagem adicionais são necessárias para identificar mulheres HPV-positivas que possuem alto risco de desenvolver CCU e precisam de colposcopia daquelas que podem retornar com segurança à triagem de rotina (SONG *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2020).

Segundo Rezhake *et al.* (2021) têm sido investigados nos últimos anos vários biomarcadores mais específicos que refletem a atividade oncogênica da infecção por HPV. Um desses biomarcadores é a proteína supressora de tumor p16^{INK4a} (p16), que desempenha um papel importante na regulação do ciclo celular ao desacelerar a progressão celular da fase G1 para a fase S inativa as quinases dependentes de ciclina (CDK4/CDK6) envolvidas na fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb) (ROELENS *et al.*, 2012). O p16 é uma proteína normalmente expressa em concentrações muito baixas em células saudáveis, em contrapartida é fortemente expresso em linhas de células de câncer cervical. Visto isso, a super expressão de p16 reflete a persistência da infecção pelo HPV e a transformação maligna das células escamosas, dessa forma, pode ser considerado uma possibilidade de biomarcador para a detecção de câncer cervical. (CAROZZI *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2021).

Outro biomarcador é o Ki-67, uma proteína nuclear não histona, que está associada à proliferação celular e tem sido sugerida como um indicador biológico sensível na progressão da NIC (SILVA *et al.*, 2017b). O Ki-67 é codificado pelo gene MKI-67 e exerce funções múltiplas na regulação da progressão do ciclo celular, sendo expressa em todas as fases, exceto durante a fase G0. Como marcador de proliferação celular, o Ki-67 prediz o potencial maligno de tumores, dessa forma a detecção desse marcador tem sido bastante utilizada no diagnóstico auxiliar de câncer cervical (YU *et al.*, 2019).

Por consequência, o p16 é considerado um gene supressor de tumor e o Ki-67 um marcador de proliferação celular. A expressão de ambas as moléculas simultaneamente manifesta algum problema no ciclo celular, pois em situações fisiológicas ambas são exclusivas e não ocorrem na mesma célula epitelial cervical. A coexpressão de p16 e Ki-67 implica na desregulação do ciclo celular induzida por HPV de alto risco. Portanto, a detecção da coexpressão desses marcadores pode ajudar a prever a transformação celular e a presença de lesões intraepiteliais (LEITE *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2019).

Portanto, uma estratégia de triagem ideal que combine alta sensibilidade e especificidade é necessária para identificar mulheres com maior risco de desenvolver CCU, as quais devem ser encaminhadas para colposcopia para posterior manejo ou tratamento (MAGKANA *et al.*, 2021). O presente estudo irá avaliar, através de revisão na literatura, os a coloração dupla dos marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67, para verificar se ambos auxiliam no diagnóstico do CCU, para que possa melhorar a precisão e eficiência do rastreamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é realizar uma revisão narrativa na literatura sobre o desempenho da coloração dupla dos marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67 como adjuvantes no diagnóstico do câncer do colo do útero.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever, de acordo com a literatura, qual a indicação do uso da coloração dupla p16/Ki-67;

Verificar a eficiência da coloração dupla dos marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67 para identificar as lesões de alto grau dentre as lesões de baixo grau;

Verificar sensibilidade e especificidade da coloração dupla dos marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67;

Verificar valores preditivos positivo e negativo da coloração dupla dos marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67;

3 METODOLOGIA

3.1 MÉTODOS DE BUSCA DOS ESTUDOS NA LITERATURA

Estudo de revisão narrativa da literatura sobre a coloração dupla dos marcadores imunocitoquímicos p16/Ki-67 como adjuvante no diagnóstico do câncer do colo do útero. A pesquisa bibliográfica foi realizada através da busca de artigos científicos nas bases de dados PubMed. O intervalo da pesquisa compreendeu o período entre os anos de 2011 a 2021. Os termos MeSH ou palavras chaves a serem utilizados para seleção dos artigos científicos serão: "Papillomaviridae" e "Cervical cancer" ambas com associação a "p16" e "Ki-67".

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios para inclusão de artigos científicos foram: pesquisas que avaliaram a coloração dupla dos marcadores imunocitoquímicos p16/Ki-67 como adjuvantes no diagnóstico do câncer do colo do útero, pesquisas que envolvam os objetivos específicos desta revisão, priorizaram-se artigos publicados nos últimos 10 anos, sendo que alguns considerados significativos fora deste período também foram utilizados e artigos completos publicados em português ou inglês.

Para exclusão de artigos científicos foram utilizados os critérios: estudos realizados in vitro e em animais de laboratório; estudos de caso; artigos duplicados.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

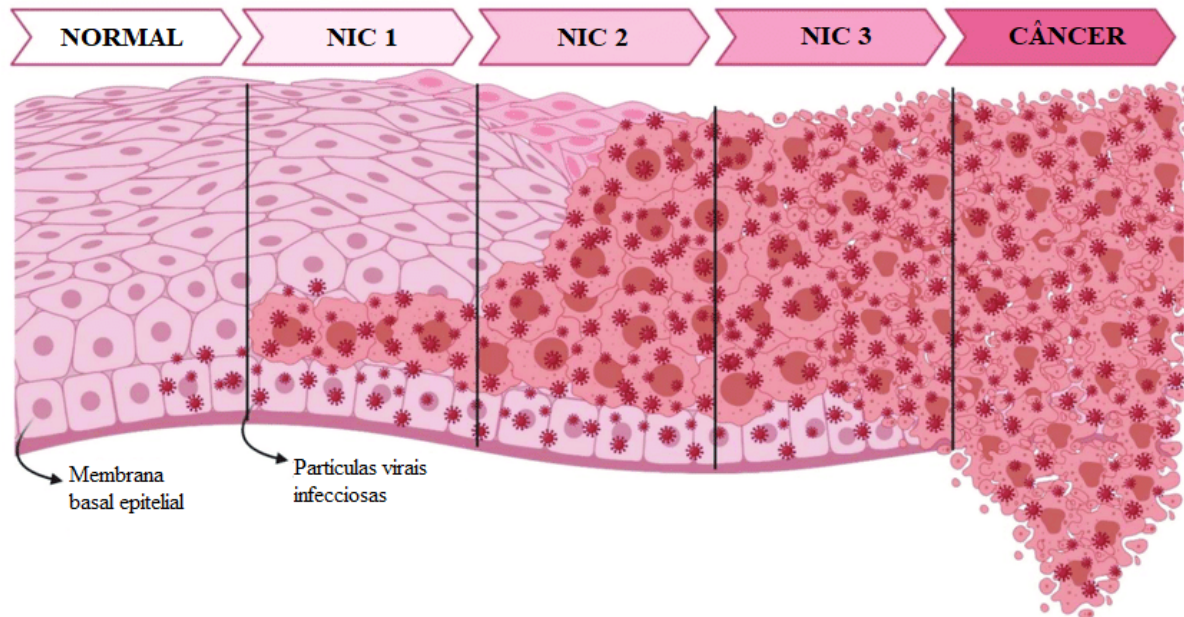
O câncer do colo do útero ou também chamado de câncer cervical é causado por uma infecção persistente por subtipos oncogênicos do Papilomavírus Humano. A infecção genital por esse vírus é muito frequente e na maioria das vezes não causa doença, porém em alguns casos ocorrem alterações celulares que podem evoluir para o câncer (INCA, 2021a).

O CCU se desenvolve no fundo da vagina, região denominado colo, onde cerca de 90% dos casos ocorrem na chamada zona de transformação, a qual é uma região onde o epitélio colunar ao ser exposto a determinadas condições fisiológicas da mulher sofre transformação, sendo substituído pelo epitélio escamoso metaplásico. Conforme a origem do epitélio comprometido, existem dois principais tipos de câncer histológicos: o carcinoma epidermóide, mais incidente (90% casos) e que acomete o epitélio escamoso, o adenocarcinoma é mais raro (10% dos casos) e acomete o epitélio glandular (INCA, 2021c).

Em um pequeno número de casos, nos quais a infecção por HPV oncogênico persiste, pode ocorrer o desenvolvimento de lesões precursoras, cuja identificação e tratamento adequado previnem a progressão para o câncer cervical invasivo. As lesões cervicais precursoras apresentam-se em graus evolutivos e podem ser classificadas em neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de graus I (lesão de baixo grau), II e III (lesões de alto grau). As alterações nas células cervicais ocorrem geralmente de forma lenta, sendo necessárias décadas para a progressão do CCU (INCA, 2021e; INCA, 2000). Essa classificação tem como base a espessura do epitélio anormal, quanto mais profundo chegam às células anormais na membrana basal até a camada superior de células, maior será o grau da NIC, como demonstrado na figura 1 (OPAS 2016).

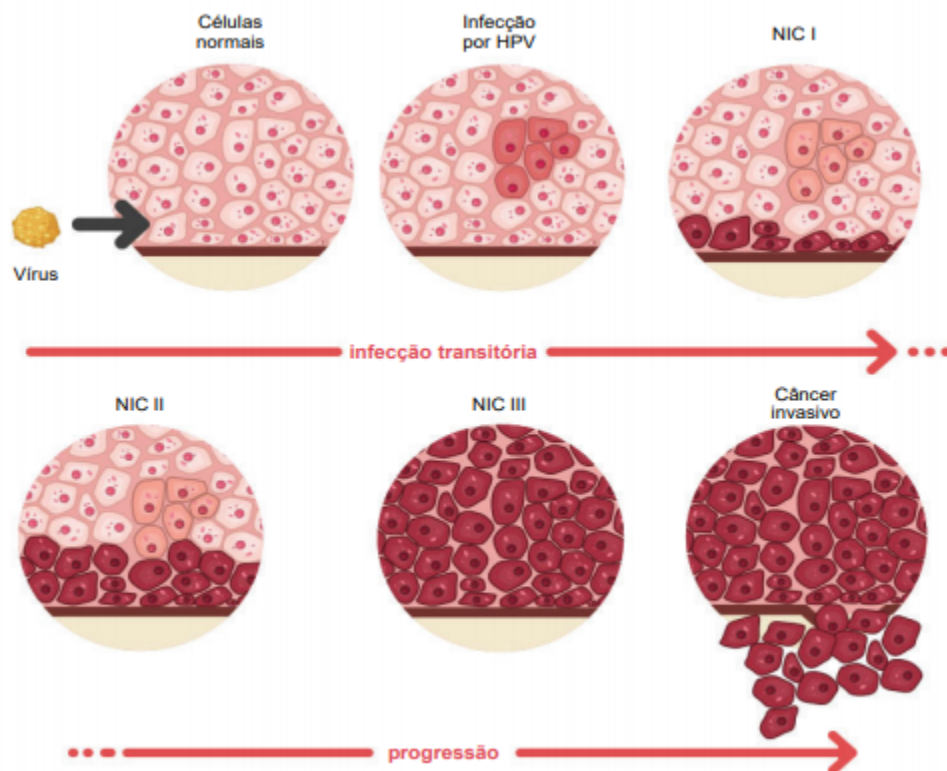
É comum que ocorra primeiramente a infecção transitória, também chamada de lesão de baixo grau (infecção por HPV e NIC I), que regride espontaneamente na maior parte dos casos, como é mostrado no primeiro bloco da figura 2. Mas há casos em que ocorre a progressão para a fase na qual são apresentadas as lesões precursoras, isto é, as lesões de alto grau (NIC II e III) com potencial de progressão até câncer invasivo, demonstrado no segundo bloco da figura 2 (GOTHWAL *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2018; INCA, 2021c).

Figura 1 - Evolução do epitélio normal até o câncer invasivo



Fonte: Adaptado de CAUSIN *et al.*, 2021

Figura 2 - Progressão do câncer do colo do útero



Fonte: INCA, 2021c

4.2 EPIDEMIOLOGIA

O CCU é o terceiro câncer mais comum em mulheres em todo o mundo, com aproximadamente 529 mil casos novos por ano. É responsável por 275 mil óbitos por ano e a quarta causa mais frequente de morte por câncer em mulheres. As áreas com menores níveis de desenvolvimento possuem as maiores taxas de incidência, isso ocorre porque países desenvolvidos possuem programas bem desenvolvidos de rastreamento do CCU e de vacinação contra o HPV (HU *et al.*, 2018; TALLON *et al.*, 2020).

O INCA estima que no Brasil para cada triênio 2020-2022 sejam esperados 16.590 novos casos de CCU, com um risco aproximado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres. É o terceiro tipo de câncer com maior incidência e a quarta de mortalidade em mulheres no país. Dado que o pico da incidência ocorre na faixa etária de 45 a 50 anos, sendo considerado raro em mulheres de até 30 anos. (INCA, 2019; INCA, 2021).

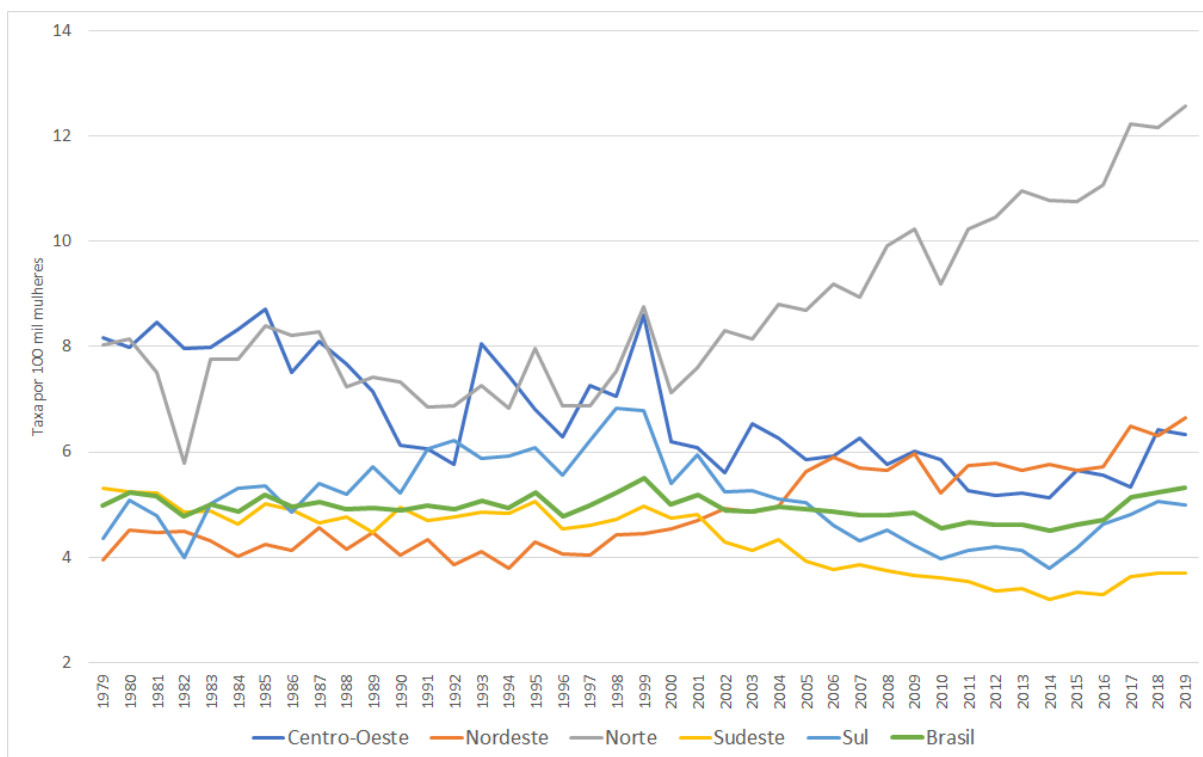
O CCU é apontado como primeiro mais incidente nas regiões Norte (26,24/100 mil), ocupa a segunda posição nas regiões Nordeste (16,10/100 mil) e Centro-Oeste (12,35/100 mil). Na região Sul (12,60/100 mil), está na quarta posição e, na região Sudeste (8,61/100 mil) a quinta posição (INCA, 2021d).

Em 2019 no Brasil, a taxa de mortalidade por CCU ajustada pela população mundial foi de 5,33 óbitos/100 mil mulheres, ou seja, ocorreram 6.596 óbitos por esta neoplasia. Como demonstrado na figura 2, na análise regional, as Regiões Norte (12,58 mortes por 100 mil mulheres) evidenciaram as maiores taxas do país, sendo a única com nítida tendência temporal de crescimento, representando a primeira causa de óbito por câncer feminino nesta região. Nas regiões Nordeste (6,66/100 mil) foi a segunda causa de mortalidade, Centro-oeste a terceira causa (6,32/100 mil). Já nas regiões Sul (4,99/100 mil) e Sudeste (3,71/100 mil) obtiveram as menores taxas, caracterizando a quinta e sexta posições, respectivamente, entre os óbitos por câncer em mulheres (INCA, 2021a).

No ano de 2020 foram esperados 3.370 novos casos de CCU em Santa Catarina (SC). Em Florianópolis, foram estimados 70 novos casos no ano de 2020 (INCA, 2019b).

Outro fator que colaborou com a diminuição das taxas de CCU, foi a introdução das vacinas contra o HPV, que diminuíram cerca de 1% a 1,9% ao ano (JOHNSON *et al.*, 2019).

Figura 3 - Taxas de mortalidade por câncer do colo do útero. Brasil e regiões, 1980 a 2019



Fonte: INCA, 2021a

4.3 FATORES DE RISCO

Um dos principais fatores causadores do desenvolvimento do CCU é a infecção persistente pelo HPV, vírus frequentemente transmitido através de relações sexuais vaginais e anais, a transmissão também pode ocorrer por contato oral-genital ou genital-genital (OLUSOLA *et al.*, 2019; DUNNE *et al.*, 2013).

O HPV é um vírus da Família do Papillomaviridae, sem envelope e com um genoma composto de DNA circular de fita dupla. Apenas uma fita do genoma de DNA é usada como modelo para a transcrição e esta fita de codificação contém três regiões genômicas. A região reguladora LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*) que contém a origem da replicação do DNA e as sequências de controle da transcrição (PRATI; MARANGONI; BOCCARDO, 2018). Além disso, existem duas regiões de codificação que possuem aproximadamente oito *open reading frames*, a região E (*Early*) que possui seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) que se expressam precocemente e a região L (*Late*) que possui dois genes (L1 e L2) que se expressam tardiamente (SOUTO *et al.*, 2005).

Atualmente, são reconhecidos 216 tipos de HPV com base em dados de sequenciamento do DNA, que foram identificados e categorizados como baixo, médio e alto risco (BURD, 2003; OLUSOLA *et al.*, 2019). Existem ao menos 13 tipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) considerados de alto risco, ou seja, possuem maior probabilidade de ocasionar infecções persistentes e estar associados a lesões precursoras. Especificamente, os tipos 16 e 18, são considerados os mais agressivos e propensos a persistir e causar câncer, e estão presentes em 70% dos casos de CCU (BHATLA *et al.*, 2020).

A infecção pelo HPV é muito comum no mundo. Conforme o INCA, cerca de 291 milhões de mulheres no mundo são portadoras do vírus, quando comparado esse dado com a incidência anual de aproximadamente 500 mil casos de CCU, pode-se concluir que mesmo na presença da infecção por HPV as chances de ocorrer câncer são raras. Por isso que o HPV é um fator necessário para o desenvolvimento do CCU, mas não suficiente, é preciso que ocorra a influência de outros fatores, para que assim possa iniciar as alterações celulares. Fatores os quais estão demonstrados no quadro 1 abaixo (INCA, 2021f; INCA, 2021c;).

Quadro 1 - Fatores que influenciam o desenvolvimento do câncer do colo do útero

Fator de risco	Comentários
Infecção pelo HPV	O DNA do HPV está presente em 99% dos CCU
Estado imunocomprometido	O sistema imunológico é importante para destruir as células cancerosas e retardar seu crescimento e disseminação, em mulheres imunocomprometidas pode evoluir para um câncer invasivo mais rápido do que normalmente.
Tabagismo	Cotina, nicotina e outros subprodutos do tabaco foram detectados na mucosa cervical e podem prejudicar a resposta imune local e danificar as células epiteliais cervicais, aumentando assim o risco de desenvolvimento de doença progressiva.
Pílulas anticoncepcionais orais	O uso prolongado de anticoncepcionais aumenta proporcionalmente o risco de câncer do colo do útero conforme a duração do uso e diminui após a interrupção.
Multiparidade	Não está claro por que essa associação existe, mas mulheres com ≥ 5 gestações foram quase duas vezes mais propensas que mulheres com 1 a 2 gestações de desenvolver CCU
Número de parceiros sexuais	mulheres com ≥ 6 parceiros sexuais tinham cerca de 3 vezes mais chances de desenvolver câncer do colo do útero do que aquelas com um parceiro sexual
Idade na primeira paridade	Mulheres que tiveram paridade antes dos 17 anos tiveram quase 3 vezes o risco de desenvolver câncer do colo do útero do que aquelas que tiveram paridade após os 25 anos.

Fonte: Adaptado de STUMBAR *et al.*, 2019

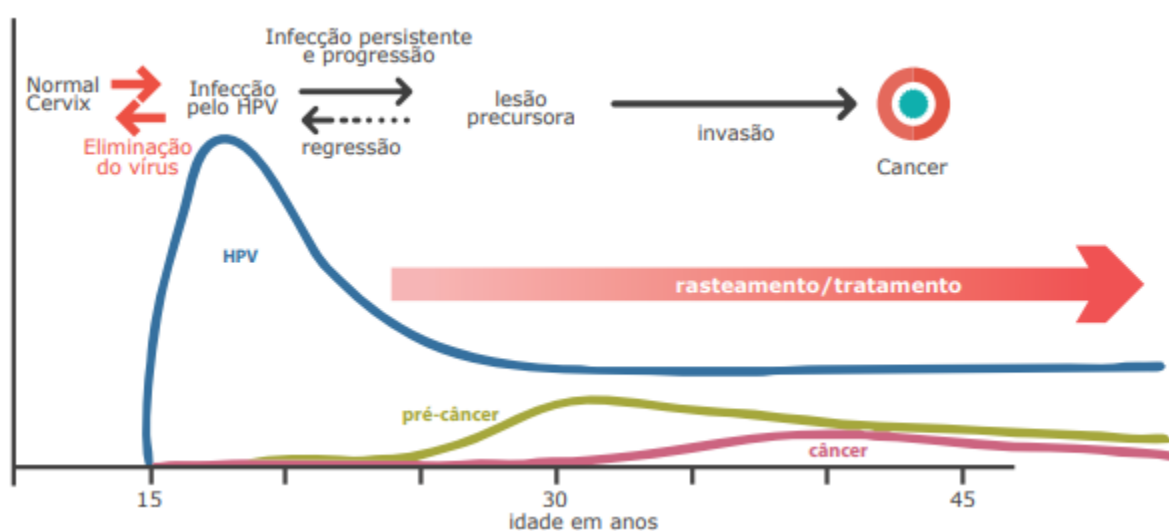
4.4 RASTREAMENTO

O diagnóstico precoce por meio de diversas técnicas de rastreamento é o principal passo na prevenção e tratamento do câncer cervical. No Brasil, o método principal e mais amplamente utilizado para rastreamento do CCU é o teste de Papanicolaou, que deve ser oferecido às mulheres na faixa etária de 25 a 64 anos, a cada três anos, após dois exames normais consecutivos no intervalo de um ano. Isso porque a maior incidência de casos de lesões pré-malignas de alto grau ocorre nesta faixa etária, as quais são possíveis de serem tratadas e não evoluírem para o câncer (BRASIL, 2010).

Em mulheres com menos de 25 anos, ocorre geralmente infecções por HPV e lesões de baixo grau que irão regredir espontaneamente na maior parte dos casos. Logo, o teste de Papanicolaou detecta lesões que nunca se transformarão em câncer, acarretando em sobre tratamento e sobre diagnóstico, o que não é custo-efetivo. (OPAS, 2016).

Segundo INCA, aproximadamente dos 15 aos 20 anos ocorre o pico da infecção pelo HPV (linha azul), mas as lesões precursoras de câncer aumentam nas mulheres entre 30 a 39 anos (linha verde) e atingem seu pico na quinta ou sexta década de vida, como é mostrado na Figura 3 abaixo (INCA, 2021c).

Figura 4 - Idade e história natural do câncer do colo do útero



Fonte: INCA, 2021c

Atualmente, a Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical (ASCCP - *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*) aprovou três abordagens de rastreamento do CCU para mulheres entre 21 a 65 anos: Papanicolaou, teste de DNA do HPV de alto risco e o co-teste (citologia mais o teste de HPV). Contudo, essas propostas implicam em uso de tecnologia não disponível no SUS. Estabeleceu também que, a utilização do teste de HPV em mulheres acima de 25 anos é preferível em relação à repetição da citologia (MAGKANA *et al.*, 2021; INCA, 2016).

O Papanicolaou ainda é o método mais utilizado, mostrou alta especificidade, porém apresenta menor sensibilidade quando comparado com o teste de HPV, o que causa a necessidade de repetir o teste de Papanicolaou em intervalos mais curtos para obter uma melhor sensibilidade (WENTZENSEN *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2019).

O teste de HPV possui maior sensibilidade, porém apresenta menor especificidade quando comparado ao Papanicolaou para detectar NIC II e III. Por apresentar uma alta sensibilidade, o teste de HPV pode prolongar o intervalo de triagem, isso faz com que esteja sendo incorporado ao rastreamento cervical, num número crescente de países, para melhorar a prevenção do CCU. Por apresentar menor especificidade, causa aumento do número de pacientes encaminhados para colposcopia desnecessariamente, pois muitas infecções regredem sem desenvolver lesões de alto grau (JOHNSON *et al.*, 2019; CAROZZI *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2021; MAGKANA *et al.*, 2021).

Muitas infecções por HPV são transitórias e podem ser eliminadas pelo sistema imunológico do corpo. Portanto, encaminhar todas as mulheres HPV-positivas para colposcopia não é viável, pois pode levar a danos potenciais, como sobrediagnóstico e tratamento excessivo. Assim, estratégias de triagem adicionais são necessárias para distinguir as mulheres HPV-positivas que estão em alto risco e precisam de colposcopia daquelas que podem retornar com segurança à triagem de rotina (HU *et al.*, 2020).

Conforme as diretrizes da *Food and Drug Administration* (FDA) para triagem primária de HPV, mulheres com HPV16 ou HPV18 positivo são imediatamente examinadas por colposcopia. Ao passo que, mulheres com HPV positivo, mas HPV16 e HPV18 negativo são examinadas pelo teste de Papanicolaou. Caso o Papanicolaou for negativo, essas mulheres serão acompanhadas 12 meses depois. Por conta da baixa sensibilidade do exame, muitas mulheres HPV positivas precisam de acompanhamento citológico repetido (SONG *et al.*, 2021; MAGKANA *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2019).

Por conseguinte, uma estratégia de triagem ideal que combine alta sensibilidade e especificidade é necessária para identificar mulheres com maior risco de desenvolver CCU, os quais devem ser encaminhadas para colposcopia para posterior manejo ou tratamento. Estudos demonstram que a citologia de coloração dupla p16/Ki-67 (CD) está se tornando um biomarcador alternativo, apresenta ter alta sensibilidade e especificidade para identificar NIC de alto grau (SONG *et al.*, 2021; MAGKANA *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2019).

4.5 MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS

Atualmente, existe uma limitação para detectar o HPV de alto risco, pois sua presença pode ser devido à infecção aguda ou transitória, e não a infecção estabelecida que apresente risco de doença ativa. Um teste de triagem robusto para diferenciar infecções transitórias de infecções estabelecidas seria muito benéfico. Nos últimos anos, têm sido investigados vários marcadores mais específicos que refletem a atividade oncogênica da infecção por HPV (REZHAKI *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2019).

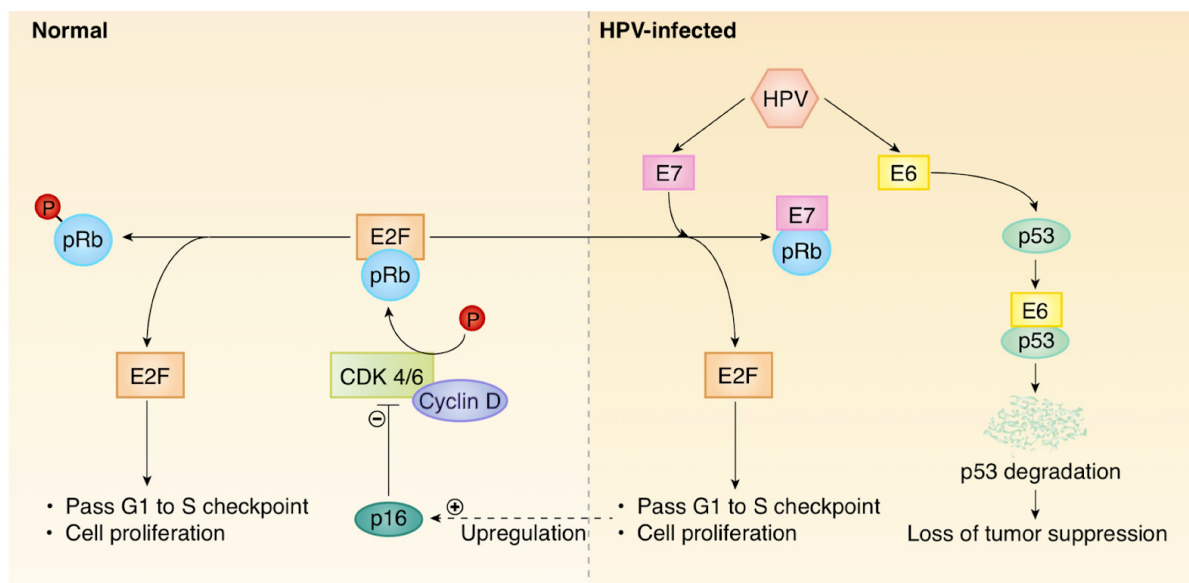
A imunocitoquímica pode ser um método valioso para ser utilizado no rastreamento do CCU, um dos principais benefícios seria poder saber quais pacientes com a alteração na citologia cervical devem ser encaminhados para colposcopia e biópsia (RAȚIU *et al.*, 2017).

4.5.1 MARCADOR P16

Um biomarcador que vem sendo estudado é a proteína supressora de tumor p16^{INK4a} (p16), que desempenha um papel importante na regulação do ciclo celular ao desacelerar a progressão celular da fase G1 para a fase S, inativa as quinases dependentes de ciclina (CDK) 4/6 envolvidas na fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb). Como demonstrado na Figura 5, normalmente CDK 4/6 formam um complexo protéico com a ciclina D para fosforilar pRb. Após a fosforilação, o pRb libera o fator de transcrição E2F em seu estado ativo, onde E2F irá induzir a transcrição de genes-alvo que promovem a transição celular da fase G1 para a fase S. Consequentemente, p16 atua como um inibidor de CDK impedindo sua interação com a ciclina D, ou seja, impedindo a progressão do ciclo celular. A regulação negativa de p16 pode levar ao câncer através da desregulação da progressão do ciclo celular (ROELENS *et al.*, 2012; CAMARA *et al.*, 2008; CAROZZI *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2019).

Na infecção por HPV de alto risco, a proteína E7 liga-se às formas hipofosforiladas da pRb e esta interação libera o fator de transcrição E2F, antes ligado à pRb, resultando também na ativação do ciclo celular, como é demonstrado na figura 5. Então, E2F ativa a transcrição dos genes necessários para a síntese de DNA. Dessa forma, pRb é inativado pela E7, resultando num aumento expressional de p16. A expressão citoplasmática e nuclear forte e difusa de p16 em carcinomas de células escamosas cervicais está predominantemente associada à infecção por HPV de alto risco. Ou seja, p16 pode ser um marcador substituto para infecção persistente por HPV de alto risco e a superexpressão de p16 foi observada na maioria dos pré-câncer e câncer do colo do útero (CAMARA *et al.*, 2008; CAROZZI *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2019).

Figura 5 - Aumento da expressão de p16 na infecção por HPV



Fonte: Wai, Strohl, Van Zante e Ha (2020)

O p16 é uma proteína normalmente expressa em concentrações muito baixas em células saudáveis, em contrapartida é fortemente expresso em linhas de células de câncer cervical. Visto isso, a super expressão de p16 reflete a persistência da infecção pelo HPV e a transformação maligna das células escamosas, dessa forma, pode ser considerado uma possibilidade de biomarcador para a detecção de câncer cervical. (CAROZZI *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2021).

Contudo, quando utilizado o marcador p16 sozinho pode ser necessário a avaliação morfológica para atingir a especificidade adequada das células coradas, o qual é demorado. Isso acontece, pois p16 também é expressa em células cervicais normais, o que torna seu uso

limitado no rastreamento. Então, foi desenvolvido um ensaio que combina a coloração p16 com a coloração para o marcador de proliferação Ki-67 em lâminas citológicas, a coexpressão de ambos marcadores em teoria deve indicar transformação relacionada ao HPV e evitar a necessidade de interpretação morfológica (SUN *et al.*, 2019; WENTZENSEN *et al.*, 2016; WENTZENSEN *et al.*, 2012).

4.5.2 MARCADOR KI-67

Outro marcador é o Ki-67, uma proteína nuclear não histona, que está associada à proliferação celular e tem sido sugerida como um indicador biológico sensível na progressão da NIC (SILVA *et al.*, 2017b). Primeiramente definido por sua cidade de origem (Kiel) e o número do clone original, o Ki-67 é codificado pelo gene MKI-67 e exerce funções múltiplas na regulação da progressão do ciclo celular, sendo expressa em todas as fases, exceto durante a fase G0. Dessa forma, Ki-67 pode ser detectado exclusivamente no núcleo de células em proliferação, enquanto células em fase G0 não o expressam (YU *et al.*, 2019; RAȚIU *et al.*, 2017).

O Ki-67 é considerado um marcador de proliferação confinado à camada de células parabasais da mucosa escamosa estratificada normal do colo do útero. Assim, a superexpressão de Ki-67 em outras camadas do epitélio se correlaciona com a extensão da maturação desordenada, ou seja, indicando que ocorreu desregulação do ciclo celular induzido pelo HPV ou a presença de NIC (RAȚIU *et al.*, 2017).

Como marcador de proliferação celular, o Ki-67 prediz o potencial maligno de tumores, assim a detecção desse marcador tem sido bastante utilizada no diagnóstico auxiliar de câncer cervical (YU *et al.*, 2019)

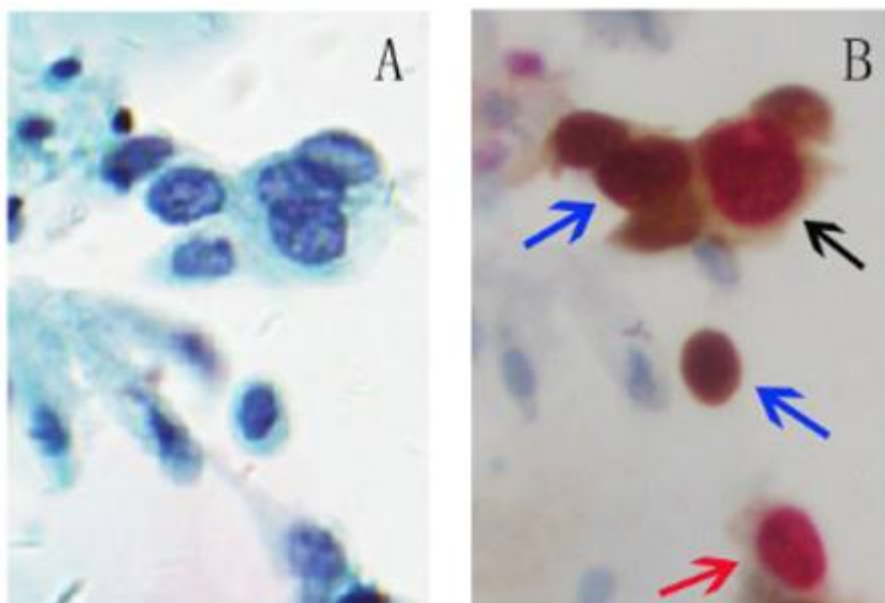
4.5.3 CITOLOGIA DE COLORAÇÃO DUPLA P16/KI-67

O marcador p16 é considerado um gene supressor de tumor e o Ki-67 um marcador de proliferação celular. A expressão de ambas as moléculas simultaneamente dentro da mesma célula epitelial cervical indica desregulação do ciclo celular, pois em situações fisiológicas ambas são exclusivas e não ocorrem na mesma célula epitelial cervical. Ou seja, a coexpressão de p16 e Ki-67 implica na desregulação do ciclo celular induzida por HPV de

alto risco. Portanto, o uso da citologia de coloração dupla p16/Ki-67 pode ajudar a prever a transformação celular e a presença de lesões intraepiteliais, através da detecção da coexpressão desses marcadores (LEITE *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019).

Segundo YU *et al.*, 2019, a co-expressão de p16/Ki-67 pode ser detectada com anticorpos contra p16 e Ki-67. Na Figura 6A, pode ser observado as células antes do uso da CD, apenas com o uso da citologia em meio líquido (SurePath). Já na Figura 6B, é mostrada a lâmina A duplamente corada com p16 e Ki-67. O marcador p16 apresenta coloração marrom no citoplasma, enquanto o Ki-67 apresenta coloração vermelha no núcleo. Assim, as células de CD positivas manifestam sinais citoplasmáticos castanhos para expressão de p16 e os sinais nucleares vermelho-escuro/castanho-avermelhado retratam a localização conjunta de p16 e Ki-67 na mesma célula. As lâminas que tiveram pelo menos uma célula epitelial cervical corada simultaneamente para p16 e Ki-67 são classificadas como positivas independente da aparência da morfologia da célula.

Figura 6 - Células com características morfológicas de HSIL



Fonte: YU *et al.*, 2019

A - Citologia baseada em líquido (SurePath). B - Células positivas para coloração dupla p16/Ki-67. Seta azul: célula com coloração de p16 isolada caracterizada por um sinal citoplasmático marrom; seta vermelha: célula com coloração de Ki-67 isolada apresentada em sinal nuclear vermelho. Seta preta: células de coloração dupla positiva de p16/Ki-67 caracterizadas por um sinal citoplasmático marrom para superexpressão de p16 e um sinal nuclear vermelho escuro para coexpressão de p16/Ki-67 na mesma célula. (mulher de 45 anos, NIC3, HPV16+, p16/Ki-67+).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE E SELEÇÃO DOS ARTIGOS

A busca pelos termos MeSH ou palavras chaves "Papillomaviridae" e "Cervical cancer" ambas com associação a "p16" e "Ki-67", foi realizada no dia 11 de novembro de 2021 e resultou em 607 artigos, já com os critérios de inclusão inseridos no filtro. Após a leitura do título e resumo, foram descartados 493 artigos, restando 114 artigos para leitura completa. Desses, 57 artigos foram selecionados com base nos critérios de inclusão e exclusão.

5.2 INDICAÇÃO DO USO DA COLORAÇÃO DUPLA P16/KI-67

O marcador p16 foi reconhecido como um marcador substituto para lesões pré-cancerosas cervicais, por ser significativamente superexpresso na transformação de infecções com HPV de alto risco, portanto pode ser considerado uma possibilidade para uso na detecção do CCU. O marcador Ki-67 indica o processo de proliferação celular, por ser proteína nuclear que não pode ser detectada na fase G0 do ciclo celular, conseqüentemente esse marcador pode ser utilizado para auxiliar na detecção do CCU (LI *et al.*, 2020).

Contudo, p16 também é expresso em células cervicais normais, o que torna seu uso limitado no rastreamento, por isso, foi desenvolvido um ensaio que combina a coloração p16 com a coloração para o marcador de proliferação Ki-67 em lâminas citológicas, a coexpressão de ambos marcadores em teoria deve indicar transformação relacionada ao HPV (SUN *et al.*, 2019; WENTZENSEN *et al.*, 2016; WENTZENSEN *et al.*, 2012).

Com isso, estudos demonstraram que a citologia de coloração dupla p16/Ki-67 mostrou-se promissora para uso na triagem de mulheres HPV-positivas para identificação de lesões pré-cancerosas do colo do útero e CCU. Portanto, mais lesões de alto grau podem ser detectadas na linha de base, assim podem ser tratadas mais cedo (UIJTERWAAL *et al.*, 2014b; HU *et al.*, 2020).

A maioria das infecções por HPV causam lesões de baixo grau e são transitórias, assim pode ser utilizado a citologia de coloração dupla p16/Ki-67 em pacientes HPV

positivos e se resultado for negativo para CD, podem ser apenas observadas em vez de qualificadas para biópsia ou colposcopia, evitando os encaminhamentos desnecessários para colposcopia (LIU *et al.*, 2020).

5.3 EFICIÊNCIA DA COLORAÇÃO DUPLA P16/KI-67 PARA IDENTIFICAR AS LESÕES DE ALTO GRAU DENTRE AS LESÕES DE BAIXO GRAU

Conforme um estudo realizado por Uijterwaal *et al.* (2014a), demonstrou que ocorre uma tendência de aumentar a positividade da CD com o aumento do grau das lesões. Em mulheres HPV-positivas houve uma prevalência de resultados positivos do teste p16/Ki-67, apresentando uma taxa de 78,9%, superior às mulheres HPV-negativas que apresentaram uma taxa de 9,4%. No estudo em questão, a positividade variou de 44,1% em mulheres sem displasia, 58,8% em mulheres com NIC 1, 80,6% em NIC 2 a 100% em mulheres com NIC 3, conforme ilustrado na tabela 1. No estudo realizado por Han e colaboradores, todas as mulheres com CCU apresentaram dupla coloração positiva para p16/Ki-67.

Tabela 1 - Taxa de positividade para o teste de coloração dupla p16/Ki-67

Referência	Teste	Pacientes	Taxas de positividade					
			Sem displasia	Neoplasia benigna	NIC I	NIC II	NIC III	Câncer
HAN <i>et al.</i> 2020	Coloração dupla p16/Ki-67	HPV 16 positivas		16,70%	23,90%	87,50%	100,00%	100,00%
		HPV 18 Positivas		0,00%	29,00%	62,50%		100,00%
UIJTERWAAL <i>et al.</i> 2014a	Coloração dupla p16/Ki-67	HPV positivas	44,10%		58,80%	80,60%	100%	
WENTZENSE N <i>et al.</i> 2014	Coloração dupla p16/Ki-67	HPV positivas		43,08%	50,00%	87,50%	90,91%	
ZHU <i>et al.</i> 2019	Coloração dupla p16/Ki-67	HPV positivas			17,50%	98,10%	100%	100%
HU <i>et al.</i> (2020)	Coloração dupla p16/Ki-67	HPV positivas	9,39%		24,05%	50,00%	67,31%	41,67%

Referência	Teste	Pacientes	Taxas de positividade					
			Sem displasia	Neoplasia benigna	NIC I	NIC II	NIC III	Câncer
WENTZENSE N <i>et al.</i> 2012	Coloração dupla p16/Ki-67	HPV positivas	50,0 %		83,3 %	75,0 %	100,0%	100,0%
WRIGHT <i>et al.</i> 2021	Coloração dupla p16/Ki-67	HPV 16 positivas	40,0%		70,2%	93,0%	91,8%	100,0%
		HPV 18 Positivas	35,0%		61,3%	77,3%	90,0%	100,0%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

A CD apresentou o intervalo de 32% a 59% de casos positivos, enquanto que a do teste de DNA de HPV foi de 85,3%. Esses dados sugerem que se for usado p16/Ki-67 ao invés do teste de HPV, o encaminhamento para colposcopia pode ser reduzido, o que se torna interessante para ser utilizado na triagem do CCU (ZHU *et al.*, 2019; WENTZENSEN *et al.*, 2012).

A CD positiva geralmente está associada a infecção por HPV de alto risco, em especial com o HPV 16 e HPV 18. A associação de positividade p16/Ki-67 com a infecção por HPV 16/18 foi de 2 a 4 vezes mais incidente, quando comparado com os casos de infecção com outros tipos de HPV de alto risco. (YU *et al.*, 2019; HAN *et al.*, 2020).

Hu *et al.*, 2020, em seu estudo demonstrou que a CD seria útil na triagem de pacientes positivos para HPV 16/18. Assim, pode ser um teste de triagem promissor para reduzir os encaminhamentos para colposcopia, mantendo alta sensibilidade para detectar lesões pré-cancerosas cervicais. Pacientes com NIC 1, os resultados positivos para CD sugerem alto risco de progressão, dessa forma sendo necessário acompanhamento.

Conforme Rossi *et al.* 2020, dados demonstram que não ocorreu nenhuma regressão em mulheres positivas para p16/Ki-67. Entretanto, as infecções por HPV em mulheres negativas para a CD possuem alta probabilidade de desaparecer a infecção em 1 ano, a regressão foi estimada em 40%.

5.4 SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E VALORES PREDITIVOS POSITIVO E NEGATIVO DA COLORAÇÃO DUPLA P16/KI-67

A CD quando comparada ao teste de HPV apresenta maior especificidade na detecção de NIC 2+. Enquanto que a especificidade do teste de HPV apresentou de 17,5% a 79,5%, a CD apresentou 58,9 a 97,2% para detecção de NIC 2+, conforme ilustrado na tabela 2. Com o aumento da especificidade da CD, ocorre contribuição para uma redução significativa dos números de pacientes HPV positivos encaminhados para colposcopia, principalmente mulheres jovens que possuem alta taxa de infecção por HPV. Estudos constataam que a CD apresenta alta sensibilidade e especificidade como teste de triagem, melhorando o diagnóstico de lesões CIN 2+ (YU *et al.*, 2019; LUTTMER *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2020; MAGKANA *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Valores da coloração dupla comparado com exame Papanicolaou e o teste de HPV.

Referências	Pacientes	Tamanho da amostra	Sensibilidade (%)			Especificidade (%)			VPP (%)			VPN (%)		
			CD	PAP	HPV	CD	PAP	HPV	CD	PAP	HPV	CD	PAP	HPV
ROSSI <i>et al.</i> , 2020	NIC 2+	3.069	75,2	61,0		74,8	76,6							
	NIC 3+		80,6	68,2										
TOLIMAN <i>et al.</i> , 2020	HSIL	243	100,0			79,6			53,7				100,0	
WENTZEN SEn <i>et al.</i> , 2014	NIC 2+	320	82,0			63,9								
HAN <i>et al.</i> , 2020	NIC 2+ HPV 16 positivas	468	91,5			77,0			73,9				92,8	
	NIC 2+ HPV 18 positivas		68,4			75,0			59,1				81,8	
ZHU <i>et al.</i> , 2019	NIC 2+	300	98,2		98,2	82,5		17,5	55,2		20,7	99,5		97,7
	NIC 3+		100,0		100,0	74,2		16,0	26,0		9,8	100,0		100,0
TORRES-I BARRA <i>et al.</i> , 2020	NIC 2+	67	55,2	23,9		80,6	87,5		31,9	23,9		91,6	87,5	
	NIC 3+	45	60,0	24,4		79,3	87,0		23,3	16,4		95,0	91,7	

Referências	Pacientes	Tamanho da amostra	Sensibilidade (%)			Especificidade (%)			VPP (%)			VPN (%)		
			CD	PAP	HPV	CD	PAP	HPV	CD	PAP	HPV	CD	PAP	HPV
LUTTMER <i>et al.</i> , 2016	NIC 2+	446	85,5	86,7	60,8	60,0	54,3	57,1	55,9	52,9	45,7	12,5	12,6	28,9
	NIC 3+		93,8	87,7	75,3	51,2	44,9	56,2	29,9	26,1	27,6	2,0	5,7	8,9
HU <i>et al.</i> , 2020	NIC 2+	486	63,4	61,9	62,9	85,2	80,0	79,5	43,0	35,1	28,1	93,0	92,3	91,6
	NIC 3+		64,6	61,9	62,9	84,8	72,4	72,1	40,3	32,9	26,4	93,8	93,1	92,4
WENTZEN SEN <i>et al.</i> , 2015	NIC 2+	175	83,4	76,6		58,9	49,6		21,0	16,6		96,4	94,2	
	NIC 3+	99	86,9	83,8		56,9	48,7		12,4	10,3		98,4	97,7	
MAGKAN A <i>et al.</i> , 2021	NIC 2+ ASCUS	200	90,4		52,3	97,2		76,4	90,4		39,2	97,2		84,6
	NIC 2+ LSIL		95,0		65,5	95,2		71,4	96,6		76,9	93,0		58,8
IKENBERG <i>et al.</i> , 2013	NIC 2+	27349	86,7	68,5		95,2	95,4		15,6	13,3		99,9	99,7	
	NIC 3+		87,4	73,6		94,8	95,1							
WRIGHT <i>et al.</i> , 2017	NIC 3+ HPV de alto risco	7727	74,9	51,9		74,1	75,0		18,5	14,0		97,4	95,2	
	NIC 3+ HPV 16/18		80,0	55,9		65,9	68,5		30,2	24,7		94,7	89,4	
WENTZEN SEN <i>et al.</i> , 2012	NIC 2+	258	86,4			59,5			60,1			86,1		
	NIC 3+	89	93,2			46,1			22,3			97,6		
WRIGHT <i>et al.</i> , 2021	NIC 2+	540	91,2	75,3		59,1	70,1		35,1	37,9		3,5	7,90	
	NIC 3+	41	91,9	77,9		54,8	66,4		21,2	23,5		1,9	4,2	
EBISCH <i>et al.</i> , 2017	NIC 2+	462	92,0	93,0	75,0	61,0	49,0	75,0	52,0	45,0	58,0	95,0	94,0	87,0
	NIC 3+		86,0	94,0	66,0	73,0	62,0	83,0	74,0	69,0	78,0	86,0	92,0	73,0
FUJII <i>et al.</i> , 2014	NIC 2+	79	87,3			76,4			45,7			96,4		
UIJTERWAAL <i>et al.</i> , 2014	NIC 2+	48	68,8			72,8			25,2			94,6		
	NIC 3+	11	73,3			70,0			8,7			98,5		

Referências	Pacientes	Tamanho da amostra	Sensibilidade (%)			Especificidade (%)			VPP (%)			VPN (%)		
			CD	PAP	HPV	CD	PAP	HPV	CD	PAP	HPV	CD	PAP	HPV
BERGERO N <i>et al.</i> , 2015	NIC 2+ ASCUS	427	94,4			78,7			16,3			99,7		
	NIC 3+ ASCUS		100,0			78,2			13,5			100,0		
	NIC 2+ LSIL	384	85,7			53,3			26,5			95,0		
	NIS 2+ ASCUS		88,0			49,3			10,8			98,3		

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

Abreviaturas: ASCUS: células atípicas de significado indeterminado; HPV: teste de HPV; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão Intraepitelial escamosa de baixo grau; NIC: neoplasia intraepitelial cervical; PAP: exame de Papanicolaou; VPN: valor preditivo negativo; VPP: valor preditivo positivo.

Wentzensen *et al.*, 2014, retrataram que a CD possui melhor sensibilidade para detecção de NIC 3+ em comparação com o Papanicolaou, como também maior especificidade em comparação com o teste do HPV. Hu e colaboradores, 2020 constataram que tanto para NIC 2+, quando para NIC 3+ a especificidade da CD foi significativamente maior do que o teste de Papanicolaou (85,28%, 80,00% respectivamente), enquanto a sensibilidade da CD permaneceu comparável a do Papanicolaou (63,49%, 61,90% respectivamente). Dados do estudo PALMS (Primary ASC-US and LSIL Marker Study), verificaram que a CD aumentou a sensibilidade para CIN 2+ em 18% em relação ao teste de Papanicolaou em mulheres de todas as idades (IKENBERG *et al.*, 2013).

Estudos têm mostrado que a CD p16/Ki-67 é útil para a triagem de mulheres HPV-positivas para identificar pacientes com alta probabilidade de potencial NIC 2+ (YU *et al.*, 2019).

Identificar mulheres com potencial de lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) de células atípicas de significado indeterminado (ASCUS) e lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) é importante, pois as mulheres diagnosticadas com ASCUS e LSIL têm um risco de 2,6% e 5,2% em 5 anos para NIC 3+, respectivamente (YU *et al.*, 2019). Além do mais, é difícil realizar uma triagem eficaz em mulheres com citologia LSIL porque a infecção transitória é muito frequente nesse grupo de mulheres e o teste de DNA do HPV geralmente

não é recomendado. Principalmente em mulheres mais jovens, que tendem a ter uma frequência muito alta de infecção pelo HPV (WALDSTRØM *et al.*, 2012).

Waldstrøm e colaboradores (2012) demonstraram que a coloração dupla apresentou alta sensibilidade para a detecção de NIC 2+ e NIC 3+ em mulheres com citologia LSIL. Os valores preditivos negativos (99,0%) altos para detectar NIC 3+, indica ser um teste seguro para uso em uma triagem. No estudo de Bergeron *et al.* (2015) a CD também atingiu altos níveis de sensibilidade de 86% e 88% para NIC 2+ e NIC 3+, respectivamente, resultando em valores preditivos negativos de 95% para NIC 2+ e 98% para CIN3+. Assim, o teste de citologia de CD torna uma opção eficiente para triagem de pacientes com resultados de citologia LSIL.

Magkana *et al.* (2021), relataram que a CD apresentou sensibilidade (90,4% e 95,0% para ASCUS e LSIL, respectivamente) superior ao teste de HPV de alto risco (53,3% e 65,5% para ASCUS e LSIL, respectivamente). A especificidade tanto nos casos de ASCUS quanto de LSIL, o p16/Ki-67 apresentou maior especificidade para o diagnóstico de NIC 2+, 97,2% e 95,2%, respectivamente. Em suma, os valores altos de sensibilidade e especificidade proporcionaram bons resultados clínicos. Assim, eles concluíram que a CD apresenta ser um ensaio seguro e rápido que pode ser usado para detectar NIC 2+ em mulheres com lesões cervicais leves.

6 CONCLUSÃO

O marcador p16 foi reconhecido como um marcador substituto para lesões pré-cancerosas cervicais, portanto pode ser considerado uma possibilidade para uso na detecção do CCU. O marcador Ki-67 indica o processo de proliferação celular, também pode estar sendo utilizado para auxiliar na detecção do CCU. Pelo fato do p16 também ser expresso em células cervicais normais, ele está sendo usado em combinação com o marcador de proliferação Ki-67, a coexpressão de ambos marcadores pode indicar transformação relacionado ao HPV, dessa forma podendo ser utilizada na triagem de mulheres HPV positivas.

Em síntese, verifica-se que a positividade da CD aumenta de acordo com o grau de progressão da neoplasia. Sendo que, a positividade dos marcadores p16/Ki-67 geralmente está associada a infecção por HPV de alto risco, em especial com o HPV 16 e HPV 18. Não ocorrendo comumente regressões em mulheres positivas para p16/Ki-67, ao contrário dos casos negativos, que possuem alta probabilidade de desaparecer a infecção em 1 ano.

O uso da coloração dupla dos marcadores imunocitoquímicos p16 e Ki-67 apresentaram ter alta especificidade quando comparada com o teste de HPV, e sensibilidade comparável ou aumentada em comparação ao teste Papanicolaou.

Como resultado, o aumento da especificidade da CD pode acarretar em um aumento da eficiência do rastreamento do CCU, a utilização da coloração dupla dos marcadores imunocitoquímicos p16/Ki-67 como uma estratégia diagnóstica para triagem de pacientes HPV positivos, pode reduzir as taxas de encaminhamentos para colposcopia, diminuindo o sobretratamento e diagnóstico excessivo. Portanto, pode ser um teste de triagem promissor para detectar lesões pré-cancerosas cervicais e câncer cervical.

REFERÊNCIAS

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Controle do câncer do colo do útero: conceito e magnitude**. Rio de Janeiro: INCA, 2021a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/conceito-e-magnitude>. Acesso em: 17 jul. 2021.

OLUSOLA, Patti; BANERJEE, Hirendra Nath; PHILLEY, Julie V.; DASGUPTA, Santanu. Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. **Cells**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 622, 21 jun. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells8060622>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Câncer do colo do útero: perguntas frequentes**. Rio de Janeiro: INCA, 2021b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/quais-sao-os-tipos-hpv-que-podem-causar-cancer>. Acesso em: 17 jul. 2021.

BURD, Eileen M.. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-17, jan. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.16.1.1-17.2003>.

VARGAS-HERNÁNDEZ, Víctor Manuel; VARGAS-AGUILAR, Víctor Manuel; TOVAR-RODRÍGUEZ, José María. Detección primaria del cáncer cervicouterino. **Cirugía y Cirujanos**, [S.L.], v. 83, n. 5, p. 448-453, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.circir.2014.09.001>.

VENKATESULU, Bhanu Prasad; MALLICK, Supriya; RATH, Goura K.. Patterns of care of cervical cancer in the elderly: a qualitative literature review. **Journal Of Geriatric Oncology**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 108-116, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgo.2016.12.004>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: Incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2021.

SILVA, Elaine Regina Prudêncio da *et al.* Screening for cervical cancer in imprisoned women in Brazil. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 0187873, 18 dez. 2017a. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0187873>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Deteção precoce do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2021c. Acesso em: 29 jul. 2021.

WUERHNER, Barbara A.; AVILA-WALLACE, Maria. Cervical cancer. **The Nurse Practitioner**, [S.L.], v. 41, n. 9, p. 18-23, 22 set. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.npr.0000490390.43604.5f>.

HU, Zheng *et al.* The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. **Cancer Medicine**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 5217-5236, 14 set. 2018.

JOHNSON, Cynae A. *et al.* Cervical Cancer: an overview of pathophysiology and management. **Seminars In Oncology Nursing**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 166-174, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.003>.

CAROZZI, Francesca; CONFORTINI, Massimo; PALMA, Paolo dalla; MISTRO, Annarosa del; GILLIO-TOS, Anna; MARCO, Laura de; GIORGI-ROSSI, Paolo; PONTENANI, Giovanni; ROSSO, Stefano; SANI, Cristina. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the ntcc randomised controlled trial. **The Lancet Oncology**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 937-945, out. 2008. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(08\)70208-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(08)70208-0).

MAGKANA, Maria; MENTZELOPOULOU, Panagiota; MAGKANA, Ekaterini; PAMPANOS, Andreas; DASKALAKIS, Georgios; DOMALI, Ekaterini; RODOLAKIS, Alexandros; PAPPAS, Kalliopi. The p16/ki-67 assay is a safe, effective and rapid approach to triage women with mild cervical lesions. **Plos One**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. e0253045, 11 jun. 2021. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0253045>.

SONG, Fangbin; BELINSON, Jerome L.; YAN, Peisha; HUANG, Xia; WANG, Chun; DU, Hui; QU, Xinfeng; WU, Ruifang. Evaluation of p16INK4a immunocytology and human papillomavirus (HPV) genotyping triage after primary HPV cervical cancer screening on self-samples in China. **Gynecologic Oncology**, [S.L.], v. 162, n. 2, p. 322-330, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2021.05.014>.

REZHAKI, Remila; WANG, Yan; CHEN, Feng; HU, Shang-Ying; ZHANG, Xun; CAO, Jian; QIAO, You-Lin; ZHAO, Fang-Hui; ARBYN, Marc. Clinical evaluation of p16 INK4a immunocytology in cervical cancer screening: a population-based cross-sectional study from rural china. **Cancer Cytopathology**, [S.L.], 7 abr. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.22428>.

PRATI, B; MARANGONI, B; BOCCARDO, E. Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer. **Clinics**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 2, 9 out. 2018. Fundacao Faculdade de Medicina. <http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2018/e539s>.

SOUTO, Rafael *et al.* O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Goiania, v. 2, n. 51, p. 155-160, maio 2005.

ROELEN, Jolien *et al.* P16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities. **Cancer Cytopathology**, [S.L.], v. 120, n. 5, p. 294-307, 14 jun. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.21205>.

CAMARA, Geni N. N. de Lima; CRUZ, Márcio Rojas; VERAS, Verônica Sales; MARTINS, Cláudia Renata F.. Os papilomavírus humanos – HPV: carcinogênese e imunogênese. **Universitas: Ciências da Saúde**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 159-168, 24 mar. 2008. Centro de Ensino Unificado de Brasília. <http://dx.doi.org/10.5102/ucs.v1i1.503>.

SILVA, Daliana Caldas; GONÇALVES, Ana Katherine; COBUCCI, Ricardo Ney; MENDONÇA, Roberta Cecília; LIMA, Paulo Henrique; CAVALCANTI, Geraldo. Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions – A systematic review. **Pathology - Research And Practice**, [S.L.], v. 213, n. 7, p. 723-729, jul. 2017b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2017.03.003>.

YU, Li; FEI, Lingyan; LIU, Xubin; PI, Xufang; WANG, Liantang; CHEN, Shangwu. Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. **Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 2654-2660, 2019. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/jca.32743>.

REYES, Mariacarolina; COOPER, Kumarasen. Cervical cancer biopsy reporting: a review. **Indian Journal Of Pathology And Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 3, p. 364, 2014. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0377-4929.138713>.

LEITE, Paulo; TAFURI, Luciene; COSTA, Maria; LIMA, Maria; SIMÕES, Renata. Evaluation of the p16 and Ki-67 Biomarkers as Predictors of the Recurrence of Premalignant Cervical Cancer Lesions after LEEP Conization. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / Rbgo Gynecology And Obstetrics**, [S.L.], v. 39, n. 06, p. 288-293, 23 fev. 2017. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0037-1598643>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero**. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/diretrizesparaorastreamentodocancerdocolodoutero_2016_corrigido.pdf.

GOTHWAL, Meenakshi; NALWA, Aasma; SINGH, Pratibha; YADAV, Garima; BHATI, Meenal; SAMRIYA, Nitesh. Role of Cervical Cancer Biomarkers p16 and Ki67 in Abnormal Cervical Cytological Smear. **The Journal Of Obstetrics And Gynecology Of India**, [S.L.], v. 71, n. 1, p. 72-77, 18 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13224-020-01380-y>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Neoplasia Intra-Epitelial Cervical - NIC**. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, 46(4), p. 355-357, INCA, 2000. Disponível em: https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n_46/v04/pdf/normas_2.pdf. Acesso em: 24 ago. 2021.

CUNHA, Ana Paula Almeida *et al.* Human papillomavirus and Its Association with Other Sexually Transmitted Coinfection among Sexually Active Women from the Northeast of Brazil. **Interdisciplinary Perspectives On Infectious Diseases**, [S.L.], v. 2020, p. 1-8, 29 out. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/8838317>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA).

Perguntas frequentes: HPV. Elaborada por Ministério da saúde. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/hpv>. Acesso em: 11 jan. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA).

Incidência. 2021d. Elaborada por Ministério da saúde. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/incidencia>.

Acesso em: 12 jan. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA).

Estimativa 2020. 2019b. Elaborada por Ministério da saúde. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 12 jan. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA).

Fatores de risco. 2021e. Elaborada por Ministério da saúde. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/fatores-de-risco>. Acesso em: 18 jan. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA).

HPV e outras infecções. 2021f. Elaborada por Ministério da saúde. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/prevencao-e-fatores-de-risco/hpv-e-outras-infeccoes>. Acesso em: 18 jan. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA).

Câncer do colo do útero: versão para profissionais de saúde. 2021g. Elaborada por

Ministério da saúde. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero/profissional-de-saude>.

Acesso em: 20 jan. 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Controle integral do câncer do colo do útero.** Guia de práticas essenciais. Washington, DC: OPAS, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Rastreamento. **Cadernos de Atenção Primária, n. 29.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

WENTZENSEN, Nicolas; SCHIFFMAN, Mark; PALMER, Timothy; ARBYN, Marc. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. **Journal Of Clinical Virology**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 49-55, mar. 2016.

WAI, Katherine C.; STROHL, Madeleine P.; VAN ZANTE, Annemieke; HA, Patrick K.. Molecular Diagnostics in Human Papillomavirus-Related Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 500, 22 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9020500>.

SUN, Hengzi; SHEN, Keng; CAO, Dongyan. Progress in immunocytochemical staining for cervical cancer screening. **Cancer Management And Research**, [S.L.], v. 11, p. 1817-1827, fev. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/cmar.s195349>.

ROSSI, Paolo Giorgi *et al.* P16/ki67 and E6/E7 mRNA Accuracy and Prognostic Value in Triaging HPV DNA-Positive Women. **Jnci: Journal of the National Cancer Institute**, [S.L.], v. 113, n. 3, p. 292-300, 3 ago. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djaa105>.

TOLIMAN, P.J. *et al.* Evaluation of p16/Ki-67 dual-stain cytology performed on self-collected vaginal and clinician-collected cervical specimens for the detection of cervical pre-cancer. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 748-752, jun. 2020. Elsevier BV.

HAN, Qin *et al.* P16/Ki-67 dual-stained cytology used for triage in cervical cancer opportunistic screening. **Chinese Journal Of Cancer Research**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 208-217, 2020. Chinese Journal of Cancer Research.

ZHU, Yuanhang *et al.* Performance of p16/Ki67 immunostaining, HPV E6/E7 mRNA testing, and HPV DNA assay to detect high-grade cervical dysplasia in women with ASCUS. **Bmc Cancer**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-9, 27 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

TORRES-IBARRA, Leticia *et al.* Adjunctive testing by cytology, p16/Ki-67 dual-stained cytology or HPV16/18 E6 oncoprotein for the management of HPV16/18 screen-positive women. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 148, n. 9, p. 2264-2273, 22 dez. 2020. Wiley.

LUTTMER, Roosmarijn *et al.* P16/Ki-67 dual-stained cytology for detecting cervical (pre)cancer in a HPV-positive gynecologic outpatient population. **Modern Pathology**, [S.L.], v. 29, n. 8, p. 870-878, 6 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC.

HU, Yuan *et al.* Evaluation of p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology in Triaging HPV-Positive Women during Cervical Cancer Screening. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 1246-1252, 10 mar. 2020.

WENTZENSEN, Nicolas *et al.* P16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. **Journal Of The National Cancer Institute**, [S.L.], v. 107, n. 12, p. 257, 15 set. 2015.

UIJTERWAAL, M H *et al.* Triaging borderline/mild dyskaryotic Pap cytology with p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: cross-sectional and longitudinal outcome study. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 110, n. 6, p. 1579-1586, 11 fev. 2014a.

IKENBERG, Hans *et al.* Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: results of the palms study. **Jnci: Journal of the National Cancer Institute**, [S.L.], v. 105, n. 20, p. 1550-1557, 4 out. 2013.

WRIGHT, Thomas C. *et al.* Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results from a sub-study nested into the athena trial. **Gynecologic Oncology**, [S.L.], v. 144, n. 1, p. 51-56, jan. 2017.

WENTZENSEN, Nicolas *et al.* Performance of p16/Ki-67 Immunostaining to Detect Cervical Cancer Precursors in a Colposcopy Referral Population. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 18, n. 15, p. 4154-4162, 6 jun. 2012.

WRIGHT, Thomas C. *et al.* Clinical validation of p16/Ki-67 dual-stained cytology triage of HPV -positive women: results from the impact trial. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 150, n. 3, p. 461-471, 25 set. 2021.

TALLON, Blenda *et al.* Tendências da mortalidade por câncer de colo no Brasil em 5 anos (2012-2016). **Saúde em Debate**, [S.L.], v. 44, n. 125, p. 362-371, jun. 2020.

STUMBAR, Sarah E. *et al.* Cervical Cancer and Its Precursors. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 117-134, mar. 2019.

BHATLA, Neerja *et al.* Primary HPV screening for cervical cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [S.L.], v. 65, p. 98-108, maio 2020.

DUNNE, Eileen F. *et al.* HPV and HPV-Associated Diseases. **Infectious Disease Clinics Of North America**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 765-778, dez. 2013.

CAUSIN, Rhafaela Lima *et al.* A Systematic Review of MicroRNAs Involved in Cervical Cancer Progression. **Cells**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 668, 17 mar. 2021.

RAȚIU, Adrian Claudiu *et al.* The importance of immunocytochemistry in the detection of high-grade cervical lesions. **Rom J Morphol Embryol**. [S.L.], v. 58, n. 4, p 1151-1156, 2017.

FUJII, Takuma *et al.* Performance of p16INK4a/Ki-67 immunocytochemistry for identifying CIN2+ in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion specimens: a japanese gynecologic oncology group study. **International Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 134-142, 18 abr. 2014.

UIJTERWAAL, Margot H. *et al.* Triage HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 136, n. 10, p. 2361-2368, 6 nov. 2014b.

LI, Yu-Cong *et al.* The Performance of Immunocytochemistry Staining as Triage Tests for High-Risk HPV-Positive Women: a 24-month prospective study. **Journal Of Oncology**, [S.L.], v. 2020, p. 1-8, 26 maio 2020.

LIU, Wei *et al.* Good performance of p16/Ki-67 dual-stain cytology for detection and post-treatment surveillance of high-grade CIN / VAIN in a prospective, cross-sectional study. **Diagnostic Cytopathology**, [S.L.], v. 48, n. 7, p. 635-644, 10 abr. 2020.

WALDSTRØM, Marianne *et al.* Evaluation of p16INK4a/Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. **Cancer Cytopathology**, [S.L.], v. 121, n. 3, p. 136-145, 17 set. 2012.

BERGERON, Christine *et al.* Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: palms study results. **Cancer Cytopathology**, [S.L.], v. 123, n. 6, p. 373-381, 17 abr. 2015.