

LÊDA MARIA SANTOS RUFINO

O uso de dupla marcação imunocitoquímica para p16/Ki67 em amostras de citologia esfoliativa em base líquida no rastreamento de lesões precursoras de câncer do canal anal em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana

BRASÍLIA, 2019

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

LÊDA MARIA SANTOS RUFINO

O uso de dupla marcação imunocitoquímica para p16/Ki67 em amostras de citologia esfoliativa em base líquida no rastreio de lesões precursoras de câncer do canal anal em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira

Coorientador: Dra. Livia Bravo Maia

BRASÍLIA 2019

Dedico este trabalho...

À grande amiga, Livia Bravo Maia. Coorientadora brilhante, professora enérgica, amiga prestativa, irmã amável e mãe protetora... Todas essas eu encontro em você, que é fonte de inspiração e muito orgulho para mim.

Desde minha chegada a Brasília, abriu caminhos e me guiou por eles. Em todos os meus passos profissionais (e também pessoais), teve papel decisivo, sempre me impulsionando a crescer, a fazer mais e melhor.

No mestrado, não poderia ser diferente. Participou de cada etapa, cada decisão, orientando, cobrando, apoiando e, sobretudo, acreditando.

Serei eternamente grata.

AGRADECIMENTOS

Antes de todos, agradeço ao Criador, por Sua presença grandiosa em minha vida. No curso deste mestrado, senti inúmeras vezes a Sua intercessão, demonstração do Seu amor. Muito obrigada!

Aos pacientes, objetos deste trabalho e de cada exame ou consulta que fiz e farei, vocês são a razão de tudo. Obrigada por me permitirem participar de suas vidas e, assim, estar cada vez mais apta a ajudar tantas outras mais.

Aos meus pais, por, no pouco tempo em que estiveram fisicamente aqui, esforçarem-se para dar aos filhos a melhor educação, mostrando-nos seu inestimável valor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira, por ter confiado em mim desde o primeiro momento e principalmente por entender as limitações na reta final do trabalho, sem desistir de mim. O senhor será sempre referência de retidão, vívida inteligência e competência.

À querida Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro, uma das grandes responsáveis por mais esta etapa acadêmica finalizada. Sem sua essencial contribuição, eu jamais conseguiria.

Às amadas mestres, Dra. Tânia Wanderley e Dra. Iolanda Gomes, que me ensinaram tudo o que sei sobre citologia, sempre com leveza e bom humor, iluminando meus dias de residência.

Aos preceptores e patologistas Gustavo Henrique Soares Takano, Larissa Cardoso Marinho, Melissa Iole Da Cás Vita, Cíntia Mara de Amorim Gomes, Ana Emília Borges de Azevedo, Albino Verçosa Magalhães e Alexandre Cavalca Tavares, que me transmitiram seus conhecimentos com admirável dedicação, driblando as muitas dificuldades e me ensinando a amar este lindo ofício.

Aos também professores Dra. Leonora Maciel de Sousa Vianna e Dr. Rivadávio Fernandes Batista de Amorim, um agradecimento especial pelos magníficos ensinamentos acerca do complexo universo acadêmico.

A Gledson Alessandro e Isabela, exímios funcionários da secretaria da pós-graduação, pela valiosa e constante ajuda. Vocês são parte importante desta conquista!

Ao irmão que a Patologia me deu, Rafael Nunes Pena, por tornar minha vida mais fácil, em todos os aspectos, todos os dias.

Aos amigos “Brasilianos”, Daniela, Diogo e Eronides, obrigada por serem minha família e meu chão no Planalto Central.

Às amigas piauienses, presentes sempre, torcendo, temendo e vibrando comigo a cada pequena vitória. Thayze, Rayssa, Anna Valérie, Maraysa, Lyssa, Haidyne, Nathália e Rafaela, com vocês, sinto que posso tudo.

A Ana Christina Sanchotene, que com sua competência, aliada ao seu imenso coração, vem transformando minha vida. Não há palavras capazes de traduzir o que sinto por você.

A Maria Tereza, minha cunhada e irmã, pelo apoio em todos os momentos, injetando-me ânimo e confiança, generosamente transmitindo-me sua singular energia!

Ao Marlos, meu companheiro de vida, pela presença paciente e amorosa e por tornar meu mundo mais colorido e cheio de significado, trazendo para ele as duas criaturinhas mais incríveis - Rodrigo e Ricardo. Amo vocês profundamente.

Ao meu irmão Cortez e ao meu sobrinho João, por serem combustível para a minha evolução e fonte ilimitada de afeto genuíno. Dois corações puros, que me alimentam e me aquecem diariamente com seu amor.

Por fim, agradeço ao meu irmão Victor. Meu exemplo maior de dedicação à profissão, ao intelecto e à vida acadêmica. Vou seguindo seus passos, pedindo e adotando seus conselhos, fazendo o possível e o impossível para ser digna da sua admiração e de carregar seu sobrenome.

Esta dissertação obedece:

Às normas para redação de dissertações e para referências bibliográficas adaptadas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER DO CANAL ANAL	15
2.1.1 Anatomia	15
2.1.2 Histórico	16
2.1.2 Nomenclatura	16
2.1.3 Patologia	17
2.1.4 Incidência	17
2.1.5 Patogênese	18
2.1.5 HPV	18
2.1.5.1.1 HPV de baixo risco	19
2.1.5.1.2 HPV de alto risco	20
2.1.5.2 HIV	20
2.1.6 Diagnóstico	21
2.1.7 Rastreamento	21
2.1.7.1 Toque retal	23
2.1.7.2 Citologia anal	23
2.1.7.2.1 Citologia esfoliativa convencional	24
2.1.7.2.2 Citologia em base líquida	25
2.1.7.3 Anuscopia de alta resolução (HRA)	26
2.1.7.4 Métodos moleculares de detecção do DNA-HPV	26
2.1.7.4.1 Hibridização com Sondas (Southern blot, Dot blot e Captura Híbrida)	27

2.1.7.4.2 Teste de Hibridização in situ (ISH)	27
2.1.7.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	27
2.1.7.4.4 Chipes de DNA	28
2.1.7.5 Imunocitoquímica	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 DESENHO DO ESTUDO E PACIENTES	31
4.2 CITOLOGIA, ANUSCOPIA E BIÓPSIA	
4.3 DETECÇÃO DE HPV USANDO MICROARRAYS	32
4.4 IMUNOCITOQUÍMICA	33
4.5 IMUNOISTOQUÍMICA	33
4.6 ANÁLISE DOS DADOS	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	39
6.1 ANÁLISE DOS DADOS	39
6.2 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	41
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASC-H: Do inglês *Squamous Atypical Cell – cannot exclude HSIL* (Células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau)

ASC-US: Do inglês *Squamous Atypical Cell Undetermined Significance* (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)

CBL: Citologia em base líquida

CC: Citologia esfoliativa convencional

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

DII: Doença inflamatória intestinal

DNA: ácido desoxirribonucleico

EUA: Estados Unidos da América

HAART: Do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy* (Terapia antirretroviral altamente ativa)

HIV: Do inglês *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HPV: Do inglês *Human Papillomavirus* (Papiloma Vírus Humano)

HR-HPV: Do inglês *High-Risk Human Papillomavirus* (Papilomavírus humano de alto risco)

HRA: Do inglês *High Resolution Anuscopy* (Anuscopia de alta resolução)

HSH: Homens que fazem sexo com homens

HSIL: Do inglês *High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepitelelial escamosa de alto grau)

HUB: Hospital Universitário de Brasília

ISH: Teste de Hibridização in situ

LAST: Do inglês *The Lower Anogenital Squamous Terminology* (Terminologia escamosa para o trato anogenital inferior)

LR-HPV: Do inglês *Low-Risk Human Papillomavirus* (Papilomavírus humano de baixo risco)

LSIL: Do inglês *Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepitelelial escamosa de baixo grau)

NIA: Neoplasia intraepitelial anal

NIAs: Neoplasias intraepiteliais anais

NIA-1: Neoplasia intraepitelial anal grau 1

NIA-2: Neoplasia intraepitelial anal grau 2

NIA-3: Neoplasia intraepitelial anal grau 3

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

NIC-1: Neoplasia intraepitelial cervical grau 1

NIC-2: Neoplasia intraepitelial cervical grau 2

NIC-3: Neoplasia intraepitelial cervical grau 3

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RNA: ácido ribonucleico

SNR: relação sinal/ruído

UnB: Universidade de Brasília

LISTAS DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

Tabela 1 - Coexpressão de p16/Ki67 e detecção de HR-HPV de acordo com os resultados de citologia e biópsia	34
Quadro 1 – Associação entre imunocitoquímica para p16/Ki67 e teste de HR-HPV com resultado da citologia em base líquida	37
Figura 1 - Coexpressão de p16/Ki67 em citologia anal. Aglomerados de células duplamente marcadas (citoplasma marrom para p16 e núcleo em vermelho para Ki67). Imunocitoquímica, 400x.	35
Figura 2 - Coexpressão de p16/Ki67 em biópsia anal. HSIL com células duplamente marcadas (citoplasma marrom para p16 e núcleo em vermelho para Ki67) em toda a espessura do epitélio. Imunoistoquímica, 200x.	36

RESUMO

O uso de dupla marcação imunocitoquímica para p16/Ki67 em amostras de citologia esfoliativa em base líquida no rastreo de lesões precursoras de câncer do canal anal em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana. [dissertação]. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina; Universidade de Brasília; 2019.

INTRODUÇÃO: Nos últimos anos, pesquisas de biomarcadores do Papilomavírus humano (HPV) têm sido desenvolvidas, a fim de incrementar a acuidade dos programas de triagem de cânceres relacionados à infecção pelo vírus. Considerando o papel da coexpressão de p16 e Ki67 na detecção de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau e carcinoma, hipotetizamos que o CINtec PLUS®, teste que evidencia a dupla marcação simultânea para p16/Ki67 teria mesmo desempenho na detecção de neoplasia intraepitelial escamosa de alto grau e carcinoma anais. Desta forma, este biomarcador também poderia ajudar a melhorar o rastreamento do câncer do canal anal. **Objetivo:** Avaliar a aplicabilidade do CINtec PLUS® na identificação de lesões precursoras de câncer do canal anal comparando-o à detecção de ácido desoxirribonucleico (DNA) de HPV de alto risco (HR-HPV) por reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras citológicas anais, em base líquida. **MÉTODOS:** Trata-se de estudo comparativo, utilizando amostras coletadas primeiramente para citologia e então para biologia molecular, por pesquisadores do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e disponibilizadas em banco de dados. As citologias em base líquida e as biópsias de amostras anais de 33 homens e mulheres infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), sem lesões visíveis detectadas ao exame externo, foram avaliadas por imunocitoquímica usando uma interpretação independente de morfologia, com dupla marcação para p16/Ki67 e pelo teste de PapilloCheck® para detecção de HR-HPV. **RESULTADOS:** Foram observadas amostras de HR-HPV positivas em 77,77% daquelas com anormalidades citológicas e em 42,85% das negativas. Expressão positiva concomitante de p16/Ki67 (p16/Ki67+) foi observada em 33,33% das amostras com anormalidades citológicas. As amostras de citologia p16/Ki67+ mostraram aglomerados de células com dupla coloração e a maioria das células positivas eram células atípicas. Na biópsia com lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) foram observadas células duplamente marcadas em toda a espessura do epitélio. A expressão de p16/Ki67 foi observada na única amostra com diagnóstico de biópsia de HSIL, mas apenas uma das sete amostras diagnosticadas com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) foi p16/Ki67+. **CONCLUSÃO:** Os resultados sugerem que a imunomarcagem para p16/Ki67 é pode ser útil para melhorar a especificidade da citologia na detecção de lesões intraepiteliais escamosas anais de alto grau. Entretanto, estudos com maior casuística são necessários para confirmação.

Palavras-chave: câncer do canal anal; citologia convencional; HIV; citologia em base líquida; HPV; lesões intraepiteliais anais; p16; Ki67.

SUMMARY

The use of p16/Ki67 double-stain immunocytochemistry in liquid-based exfoliative cytology specimens to screen for precursor lesions of the anal canal cancer in patients infected with human immunodeficiency virus. [Master's thesis]. Postgraduate Program in Medical Sciences, Medical College; University of Brasilia; 2019.

INTRODUCTION: In recent years, researches on Human Papillomavirus (HPV) biomarkers have been developed in order to increase the accuracy of cancer screening programs related to virus infection. Considering the role of p16 and Ki67 co-expression in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma, we hypothesized that CINtec PLUS®, an immunostain test that shows the simultaneous double-staining for p16/Ki67, has the same performance in detecting high-grade anal intraepithelial neoplasia and anal carcinoma. Thus, this biomarker could also help to improve anal cancer screening. **OBJECTIVE:** To evaluate the performance of CINtec PLUS® and high-risk DNA-HPV (HR-HPV) detection by PCR in anal cytology specimens. **METHODS:** This is a comparative study using samples that were collected first for cytology and then for molecular biology, by researchers of the University of Brasilia's Hospital and made available in a database. Liquid-based cytology and biopsy of anal samples from 33 men and women infected by the Human Immunodeficiency Virus (HIV), with no visible lesions detected on external examination, were evaluated by immunocytochemistry using a morphology independent interpretation of the double-stain for p16/Ki67 and by the PapilloCheck® test for HPV detection. **RESULTS:** HR-HPV positive samples were observed in 77.77% of those with cytological abnormalities and in 42.85% of the negative samples. Concomitant positive expression of p16/Ki67 (p16/Ki67+) was observed in 33.33% of samples with cytological abnormalities. P16/Ki67+ cytology samples showed double-stained cell clusters and most positive cells were atypical cells. In biopsy with high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), double-stained cells were observed in full thickness of the epithelium. P16/Ki67 expression was observed in the only sample diagnosed as HSIL by biopsy, but only one of the seven samples diagnosed as low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) was p16/Ki67+. **CONCLUSION:** The results suggest that p16/Ki67 immunostaining may be useful for improving cytology specificity in detecting high-grade anal squamous intraepithelial lesions. However, other studies with major number of cases are required to confirm it.

Keywords: anal canal cancer; conventional cytology; HIV; liquid-based cytology; HPV; anal intraepithelial lesions; p16; Ki67.

1 INTRODUÇÃO

O câncer anal é definido como aquele que acomete o canal e as bordas externas do ânus. As lesões malignas surgem em tipos distintos de tecidos, e o carcinoma epidermoide é o mais comum nesta localização, sendo responsável por cerca de 85% dos casos. Trata-se de tumor raro, constituindo de 1 a 2% de todas as neoplasias malignas colorretais (INCA, 2018). Nos Estados Unidos da América (EUA), para 2019, estão estimados 8.300 novos casos de câncer anal, representando 0,5% do total de neoplasias malignas surgidas no ano. Prevê-se, ainda em 2019, 1.280 mortes decorrentes desse tipo de tumor, compreendendo 0,2% da mortalidade geral por câncer no país (NIC, 2019).

No Brasil, de acordo com a última estatística disponibilizada pelo Instituto Nacional do Câncer, o câncer do canal anal foi responsável por 406 óbitos, sendo 148 homens e 258 mulheres, no ano de 2015 (INCA, 2018). As internações em decorrência de tumores malignos de reto, ânus e canal anal vêm aumentando no Sistema Único de Saúde brasileiro nos últimos anos (DURAES; SOUSA, 2010).

Há fatores de risco bem estabelecidos para este tipo de câncer, destacando-se as infecções por Papilomavírus Humano (HPV) e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Homens que fazem sexo com homens (HSH), prática de sexo anal receptivo, outras infecções sexualmente transmissíveis, como gonorreia e clamídia, fistula anal crônica, tabagismo e imunossupressão após transplantes de rim ou coração estão entre as condições que aumentam as chances de ser acometido pela doença (INCA, 2018; NIC, 2019).

A imunossupressão médica pós-transplante de órgãos sólidos está associada à ocorrência de neoplasias intraepiteliais anais (NIA) e de câncer anal. Uma revisão da literatura de 2007 evidenciou que a predominância de NIA entre pacientes transplantados renais era de 20%, e as taxas de infecção anal de HPV nestes pacientes se aproximaram de 50%, observando-se aumento do risco relativo de câncer anal em 10% para esses indivíduos. Além da imunossupressão, sua duração e intensidade contribuem para o aumento do risco de câncer anal e NIA. Imunodeprimidos em decorrência de outras doenças, incluindo doença inflamatória intestinal (DII), já foram considerados de risco para desenvolvimento de NIA. Os pacientes com Doença de Crohn apresentaram taxas mais elevadas e estágio inicial mais avançado do câncer anal. No entanto, uma revisão retrospectiva de pacientes com DII constatou que as taxas de NIA eram semelhantes, independentemente do status imunossupressor (SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

Os cânceres cervical e do canal anal e suas lesões precursoras – neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e neoplasia intraepitelial anal (NIA), respectivamente - compartilham semelhanças biológicas e morfológicas. A principal similaridade biológica é a relação causal entre o HPV oncogênico e de alto risco (HR-HPV) e o desenvolvimento de carcinomas dessas regiões. Morfológicamente, as alterações observadas, tanto na citologia quanto na histologia, são análogas em ambas as patologias (DARRAGH; WINKLER, 2011).

Considerando as semelhanças entre as neoplasias, o sucesso da estratégia de rastreio do câncer colo uterino levou a seu uso como modelo para rastreamento de câncer anal em grupos de alto risco. Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de estabelecer e validar programas para a detecção precoce dessas lesões (DARRAGH; WINKLER, 2011; MAIA, 2013).

Atualmente, o rastreamento consiste na detecção de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL), precursoras do câncer, utilizando citologia anal. Embora essa abordagem seja sensível, a especificidade é baixa, levando a um excesso no número de procedimentos invasivos, incluindo realizações desnecessárias de anoscopia de alta resolução (HRA) e biópsias anais, com elevação dos custos. Assim, novos procedimentos diagnósticos são justificados para superar as limitações do rastreamento baseado em citologia anal em populações suscetíveis (SERRANO-VILLAR et al., 2017).

Nos últimos anos, pesquisas com biomarcadores do HPV têm sido desenvolvidas, a fim de incrementar a acuidade dos programas de triagem de cânceres relacionados à infecção pelo vírus. Nas células epiteliais, o HR-HPV regula a expressão da proteína p16 através da oncoproteína viral E7 e induz a expressão de Ki67, refletindo o aumento da proliferação epitelial. A coexpressão dessas proteínas (p16/Ki67) não ocorre em condições fisiológicas, indicando um desequilíbrio do ciclo celular e tendo sido associada à progressão da infecção por HPV na região cervical para HSIL. A sua utilização nas amostras de citologia cervical tem reduzido o número de colposcopias desnecessárias em mulheres. Desta forma, este biomarcador também pode ajudar a melhorar o rastreamento do câncer anal (SERRANO-VILLAR et al., 2017; UIJTERWAAL et al., 2015; REUSCHENBACH et al., 2010; ZHU et al., 2019).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER DO CANAL ANAL

2.1.1 Anatomia

O canal anal fisiológico ou cirúrgico é definido como a porção final do intestino grosso, estendendo-se do nível do assoalho pélvico (anel anorretal ou junção da porção puborretal do músculo elevador do ânus com o esfíncter anal externo) à margem anal. Neoplasias originadas em regiões distintas como margem anal ou região perianal eram todas classificadas como lesões do canal anal. Isso estimulou uma padronização da nomenclatura entre clínicos e cirurgiões, uma vez que as histórias naturais das patologias eram inerentes às diferentes localizações. Em 2007, a American Society of Colorectal Surgeons propôs uma nova terminologia baseada em regiões de referência que poderiam ser facilmente identificadas pelo examinador e, além disso, introduziram uma nova área de transição. As recomendações foram amplamente aceitas e adotadas pelo American Joint Committee on Cancer para estadiamento do câncer anal. Desta forma, o canal anal passou a ser referido como ‘região anal’ e dividido em três partes, sendo estas canal anal, região perianal e pele (PANDEY, 2012).

Assim definido macroscopicamente, o canal anal corresponde ao segmento que é envolto pelo esfíncter anal interno, com cerca de 4 cm de comprimento. Inicia-se na junção anorretal e termina na junção mucocutânea, tendo a linha pectínea localizada aproximadamente em seu ponto médio. A zona de transição instituída compreende área 6 a 10 mm proximal à linha pectínea ou linha denteada, com cerca de 4 a 5 mm de extensão, onde o epitélio do reto é substituído pelo epitélio urothelium-like, local em que podem ser observadas células escamosas sobre o epitélio colunar. Lateralmente, o canal anal relaciona-se com a fossa ísquio-anal, anteriormente é limitado pelo corpo perineal, que o separa do terço inferior da vagina, nas mulheres, e do bulbo peniano ou uretra membranosa, nos homens. O topo da junção anorretal é denominado de flexura perineal, região que forma um ângulo agudo posteriormente produzido pela inserção do músculo puborretal.

O canal anal apresenta uma camada de epitélio que recobre o tecido subepitelial, ricamente vascularizado, e duas camadas musculares, uma circular e outra, mais externa, longitudinal, sendo circundado pelos esfíncteres anais externo e interno. O esfíncter externo é longitudinal e constituído por musculatura esquelética voluntária. O interno é formado por musculatura lisa, controlada pelo

sistema nervoso autônomo, e contínua à musculatura lisa do retossigmoide. A partir de aproximadamente 2 cm da borda anal até a junção anorretal, observam-se de 6 a 10 colunas longitudinais na mucosa, cada uma contendo artéria e veia. A borda inferior dessas colunas forma conjuntamente uma linha, denominada de linha denteada ou linha pectínea. O pecten, nessa localização, apresenta-se como epitélio transicional (MAIA, 2013; PANDEY, 2012). Histologicamente, o canal anal é dividido conforme o epitélio de revestimento em: zona colorretal – revestida por mucosa glandular; zona de transição – contendo epitélios escamoso e glandular; e porção distal – apresentando somente epitélio escamoso. Também podem ser encontrados melanócitos, células mucinosas e endócrinas (MAIA, 2013; SHIA, 2010).

2.1.2 Histórico

A primeira descrição de lesão anal pré-invasiva não distinguiu a região anal do canal anal. Essas lesões, inicialmente cutâneas, foram descritas como Doença de Bowen e Carcinoma “in situ”. Em 1962, houve a necessidade de se distinguir tumores que se originam das regiões anal e perianal, devido às suas diferenças biológicas e comportamentos clínicos. Após a observação da presença de CIS adjacente a uma verruga anal, feita por Oriel e Whimster em 1971, foi sugerida a relação da Doença de Bowen com infecção viral (DARRAGH et al, 2013). Em 1981, Fenger e Bichel publicaram o primeiro estudo de alterações displásicas do canal anal. Em 1986, os mesmos autores descreveram a presença de displasia e carcinoma “in situ” adjacentes à maioria dos carcinomas anais, mostrando que as lesões anais compartilham um padrão de HPV oncogênico visto em lesões cervicais e de outras áreas do trato anogenital baixo (DARRAGH, 2013). Somente após a documentação do subtipo 16 do HPV no câncer cervical, tornou-se plausível a associação do HPV com o câncer e lesões pré-cancerosas anais. Essa relação foi confirmada em 1995 com a documentação dos tipos oncogênicos do HPV (MAIA, 2013).

2.1.2 Nomenclatura

O HPV relacionado a displasias escamosas é um precursor do carcinoma de células escamosas invasivas em vários sítios anatômicos, incluindo o trato anogenital. O projeto de padronização da Terminologia Escamosa Para o Trato Anogenital Inferior (LAST) para lesões associadas ao HPV forneceu diretrizes para unificar a nomenclatura. A terminologia recomendada estratifica as lesões,

definindo-as como lesões intraepiteliais escamosas de baixo ou alto grau (LSIL ou HSIL, respectivamente). No canal anal, a LSIL se correlaciona com neoplasia intraepitelial anal grau 1 (NIA-1) ou condiloma anal, enquanto a HSIL corresponde às neoplasias intraepiteliais anais graus 2 (NIA-2) e 3 (NIA-3). Esse sistema, baseado em avaliação de consenso, reflete com mais precisão a biologia das lesões relacionadas ao HPV (SIDDHARTHAN, 2019; DARRAGH, 2013).

A lesão intraepitelial escamosa anal é caracterizada por proliferação displásica de células epiteliais escamosas na zona de transição do canal anal. Essas lesões são pré-malignas e podem progredir para carcinoma escamoso, caso não sejam tratadas (ROBERTS; SIEKAS; KAZ, 2017; SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019). A NIA tem associação com o HPV e é mais prevalente em populações de risco, como pacientes portadores de HIV, HSH e pacientes transplantados renais e cardíacos. Nessas populações, as taxas de câncer anal são bastante elevadas, apesar de ser, em geral, uma doença relativamente incomum (STANLEY, 2012).

2.1.3 Patologia

A avaliação patológica da NIA passou por várias alterações. Considerando-se a classificação mais aceita, baseada no projeto LAST, as características histológicas das LSIL são atipia celular superficial, com ampliação nuclear e irregularidade de contorno da membrana nuclear, exibindo relação núcleo-citoplasma preservada. Já as HSIL envolvem todo o epitélio, ou os dois terços inferiores, e é tipificada por perda de maturação, hipercromasia e irregularidade da membrana nuclear, além de diminuição na relação núcleo-citoplasma (SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

2.1.4 Incidência

É difícil estimar a incidência de NIA na população geral. As taxas de câncer anal são baixas, com aproximadamente 1,8 casos por 100.000 homens e mulheres, sendo fortemente influenciadas pelos fatores de risco já enunciados. Vários estudos têm tentado esclarecer as tendências modernas de NIA e câncer anal. Em todo o mundo, antes da década de 1990, as taxas de câncer anal eram mais elevadas nas mulheres do que nos homens, enquanto nos últimos anos as taxas têm sido equivalentes. As mulheres têm maior incidência de câncer anal após os 50 anos, entretanto a maioria dos pacientes

é homem, entre as idades de 20 a 49 anos (SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019; JOHNSON, 2004).

Estudo da Dinamarca analisou dados de 1978-2008 para caracterizar a doença a nível nacional. Comparando dados anteriores à década de 1980 com dados pós-2003, eles descobriram que a incidência de câncer anal aumentou para homens e mulheres. Observaram ainda aumento anual de 5% na incidência de NIA de alto grau entre 1998 e 2008. O aumento anual de NIAs foi maior do que o aumento anual do câncer anal, provavelmente refletindo taxas mais elevadas de rastreamento. Independentemente disso, o escopo da doença foi maior do que se pensava (NIELSEN; MUNK; KJAER, 2012).

A taxa de conversão de NIA para câncer anal permanece controversa. Estudos prospectivos preliminares sugerem que a taxa é semelhante à do câncer cervical, com cerca de 9-13% de conversão para NIA-3 dentro de um período de 5 anos, para pacientes não tratados (SCHOLEFIELD et al., 2005; WATSON et al., 2006), mas há variabilidade entre populações de risco, com taxas mais elevadas em HIV-positivos e imunocomprometidos. Apesar desses estudos prospectivos, grande metanálise de 2012 constatou que a taxa de conversão foi menor, com taxas de progressão de 1 em 600 por ano para HSH HIV positivos, e de 1 em 4000 por ano para pacientes com HSH HIV negativos (MACHALEK, 2012). Essa discrepância pode ser atribuída à mistura de pacientes NIA-2 e NIA-3 dentro da metanálise, enquanto os estudos prospectivos seguiram apenas NIA-3. A regressão espontânea de NIA ocorre em uma parcela dos pacientes. Estudo retrospectivo evidenciou que NIAs de alto grau regridem para NIA-1 a uma taxa de 17%, e para ausência de doença a uma taxa de 7%. Esses pacientes foram uma mistura de HIV-positivo e HIV-negativo (TONG, 2013).

2.1.5 Patogênese

2.1.5.1 HPV

O HPV é um vírus sexualmente transmissível que atualmente infecta número estimado de 79 milhões de americanos. Aproximadamente 14 milhões de pessoas são infectadas a cada ano. É fato conhecido que a maioria dos homens e mulheres sexualmente ativos será infectado pelo HPV em algum momento de sua vida, embora 90% delas serão silenciosas e irão se resolver espontaneamente (SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019). O HPV é um vírus de DNA de dupla-hélice não encapsulado, que infecta a mucosa e queratinócitos cutâneos. Há mais de 180 subtipos do vírus,

30 dos quais são potencialmente patógenos do trato anogenital. De acordo com o potencial oncogênico, esses subtipos podem ser categorizados em alto risco (HR-HPV) versus baixo risco (LR-HPV). A infecção pelo HPV foi estabelecida como uma das principais causas de câncer e seu efeito causal no câncer cervical foi firmemente estabelecido (PIRTEA, 2019).

Análises retrospectivas mostraram que o HPV tem clara associação com NIA e câncer anal. A prevalência de HPV entre pacientes com NIA é superior a 90% (PIRTEA et al., 2019). Uma metanálise que comparou o câncer cervical, o carcinoma vulvar e o câncer anal constatou que os pacientes com câncer anal apresentaram a maior prevalência de infecção por HPV (84,3%). Soma-se a isso o achado de que quantidades de DNA do HPV encontradas em espécimes de biópsia é maior para NIA de grau superior do que para a NIA de grau inferior, sugerindo um papel no desenvolvimento da malignidade (DE VUYST, 2009). Embora os pacientes considerados de alto risco muitas vezes tenham infecção por HPV, a infecção pode ocorrer em pacientes heterossexuais e não infectados pelo HIV. Vários estudos encontraram HPV no canal anal de homens heterossexuais, com taxas que variam entre 8-30%. Para as mulheres HIV-negativas, a prevalência de HPV anal se aproxima de 27%. Esses estudos sugerem que o HPV anal é muito mais prevalente do que se pensava anteriormente (DE VUYST, 2009; SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

A correlação entre NIA e HPV é forte e dados recentes mostraram que o HPV pode ser agente para o desenvolvimento de NIA. Estudos microscópicos iniciais demonstraram partículas de HPV dentro de células malignas e trabalhos atuais utilizando PCR mostraram uma grande quantidade de DNA viral dentro das células tumorais. O mecanismo biológico para a transformação maligna das células é mediado pela capacidade do HPV de codificar as proteínas supressoras tumorais E5, E6 e E7, que alteram a expressão intracelular da proteína p53, levando a mudanças no crescimento celular e apoptose (MÜNGER, 2004). NIAs de alto grau e câncer anal são caracterizados pelo aumento da expressão gênica e pela perda da expressão do gene L (gene capsídeo viral) (WATSON, 2006).

2.1.5.1.1 HPV de baixo risco

Os subtipos de baixo risco mais comuns de HPV são 6, 11, 40, 42, 43, 44 e 55, associados à NIA-1 e carregam menor risco de malignidade. A maioria das infecções por HPV se enquadra nessa categoria de baixo risco. Estudos epidemiológicos têm mostrado que o HPV 6 está associado a 3% dos cânceres anais, mas isso é atribuído à infecção concomitante com os subtipos de alto risco mais comuns de HPV. Apesar do baixo risco de câncer, a carga da doença de NIA-1 pode ser grande. Os

pacientes muitas vezes precisam de tratamento local e vigilância (SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

2.1.5.1.2 HPV de alto risco

Os subtipos de HPV de alto risco são 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 68, 73, 82, 53, 66, 70, sendo 16 e 18 os mais pesquisados. HR-HPV está associado às NIA-2 e NIA -3, e as estimativas atribuem 80-90% dos cânceres anais a essas cepas, mais comumente o subtipo 16. O subtipo 18, por outro lado, é encontrado mais comumente no câncer cervical e está associado ao adenocarcinoma, em oposição ao 16, mais comumente associado ao carcinoma escamoso (DE VUYST, 2009). O câncer anal associado ao HR-HPV é mais comumente encontrado dentro do canal anal e é menos provável de estar associado à pele perianal (SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

2.1.5.2 HIV

A infecção pelo HIV continua a ser um grande problema de saúde pública e está associada a aumento da incidência de NIA e câncer anal, particularmente em HSH. A taxa exata de NIA entre pacientes HIV-positivos não é conhecida, mas as taxas de câncer anal são 30-100 vezes maiores do que na população em geral; entre os pacientes HIV-positivos, 80% dos cânceres anais ocorrem em HSH. A maior incidência de NIA e câncer anal entre pacientes HIV-positivos é multifatorial, mas provavelmente reflete uma alta prevalência de coinfeção com HPV. Estima-se que 72-90% dos pacientes HIV-positivos estão infectados com HPV e que 90% dos pacientes HIV-positivos com NIA foram infectados com algum subtipo de HR-HPV. A fisiopatologia da infecção pelo HPV entre pacientes HIV-positivos deve-se à imunodeficiência desses pacientes, que não conseguem impedir a propagação das proteínas do HPV (E2, ZE6, E7) associadas à HSIL (WASSERMAN; RUBIN; TURETT, 2017; WHO, 2018).

Nos últimos 30 anos, o tratamento baseado em terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) revolucionou o tratamento do HIV, com melhor mortalidade e morbidade. Apesar dessas melhorias, a incidência de câncer anal aumentou em pacientes HIV-positivos (WHO, 2018). Os dados retrospectivos não foram conclusivos sobre a relação entre a diminuição da contagem de CD4 e o aumento do risco de câncer anal – alguns estudos apoiam a relação (BEDIMO et al., 2009),

enquanto outros não (ENGELS et al., 2008). Os benefícios da HAART melhoram a sobrevida geral de pacientes HIV-positivos, mas seu efeito específico sobre as NIAs e o câncer anal é inconclusivo (SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico de NIA é feito através de citologia ou biópsia durante exames de rotina. A citologia anal pode ser colhida consultório médico, usando-se uma escova de coleta. Se o rastreamento for positivo para HSIL ou LSIL, os pacientes devem ser encaminhados para anoscopia com magnificação e biópsia. A sensibilidade relatada da citologia anal para a detecção de qualquer grau de NIA varia de 47 a 90%, observando-se melhores índices para HSIL ou áreas maiores de doença. A especificidade é menor, com intervalos de 32 a 60% (LEEDS; FANG, 2016; SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

Além da citologia, o exame visual do ânus com observação direta é parte importante do diagnóstico de NIAs. Alterações na coloração ou irregularidades da mucosa podem indicar lesões potenciais, que precisarão ser biopsiadas. Apesar de seus benefícios, o exame visual e o toque retal sozinhos não são suficientes para o rastreio ou diagnóstico de NIAs. A biópsia pode ser realizada através de anoscopia convencional ou HRA, fornecendo tecido suficiente para avaliação microscópica, a fim de determinar a presença de LSIL ou HSIL. A grande vantagem da biópsia é permitir a avaliação arquitetural e, assim, o diagnóstico definitivo, sendo o exame histopatológico considerado o padrão-ouro. A HRA é uma ferramenta que pode ser utilizada no consultório para diagnosticar NIA, bem como para a intervenção terapêutica. Após a aplicação de ácido acético, um anuscópio associado a sistema de amplificação das imagens é usado para examinar o canal anal. A aplicação de ácido acético fará com que as células displásicas sejam identificadas, permitindo uma coleta acurada (LEEDS; FANG, 2016; SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

2.1.7 Rastreamento

O protocolo de triagem para NIA de baixo ou alto grau não é padronizado e permanece controverso. Os proponentes do rastreamento alegam que a detecção precoce e o tratamento das NIAs podem impedir que a lesão pré-maligna progrida para o câncer anal. Os benefícios do rastreamento são claros no câncer cervical e sua aplicação no câncer anal parece apropriada, dada a sua semelhança

com o câncer cervical em termos de fisiopatologia (SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

Indivíduos de baixo risco são aqueles que são imunocompetentes, HIV-negativos, não-HSH, sem DII e sem história de câncer cervical. Não há evidências de que esses indivíduos devam ser rastreados, dada a baixa incidência de NIA ou câncer anal dentro dessas populações. Eles se beneficiariam de um exame se desenvolvessem sinais preocupantes para NIA ou câncer anal, como massas palpáveis, corrimento retal, verrugas ou sangramento (LEEDS; FANG, 2016).

Pacientes de alto risco são aqueles HIV-positivos, HSH ou imunocomprometidos. Apesar da falta de diretrizes das principais sociedades gastrointestinais médicas ou cirúrgicas, várias sociedades de doenças infecciosas têm recomendado citologia anual para pacientes HIV-positivos, especialmente aqueles que são HSH ou que têm história de câncer cervical. Uma revisão retrospectiva de 2015 mostrou que os pacientes seguidos com anoscopia padrão ou HRA a cada 3-12 meses apresentaram menores taxas de progressão de NIA para câncer anal, em comparação com dados epidemiológicos (LONG, 2016).

Especialistas reconheceram, em 2012, que a citologia estava sendo usada para triagem de pacientes de alto risco, embora tenha sido levantada preocupação com as altas taxas de diagnósticos falso-negativos relatadas em pacientes HIV-positivos. Entretanto, eles concordaram com as sociedades de doenças infecciosas e recomendaram citologia para pacientes de alto risco e, caso positivas, encaminhamento a um especialista em anoscopia. A triagem foi considerada econômica para as NIAs, mas sua implementação permanece variável (LONG et al., 2016; STEELE et al., 2012).

As ferramentas de triagem ideal para pacientes de alto risco têm sido discutidas. A citologia é relativamente fácil e pode ser feita em consultório médico; no entanto, como dito acima, pode ter alta taxa de falso-negativos para pacientes de alto risco. Por isso, alguns têm defendido que os pacientes de alto risco devam ser submetidos a HRA para triagem, dada a sua melhor sensibilidade e especificidade, bem como à capacidade de tratar no momento do rastreamento (STEELE et al., 2012). As maiores desvantagens dessa estratégia são 1) número insuficiente de profissionais habilitados a fazer HRA e 2) o alto custo operacional. Não há consenso estabelecido para o seguimento, embora a maioria das sociedades recomende vigilância anual para homens HIV-positivos sem lesões detectadas, e a cada 3-6 meses para aqueles com NIA de baixo ou alto grau. Não houve estudos prospectivos examinando o prazo de acompanhamento e, dada a natureza variável do desenvolvimento de NIA em câncer anal, é difícil estabelecer diretrizes padronizadas (LONG et al., 2016; STEELE et al., 2012).

2.1.7.1 Toque retal

É um exame de fácil execução e pode ser realizado ambulatorialmente. Seu principal objetivo é o diagnóstico das lesões invasoras ainda assintomáticas (DARRAGH; WINKLER, 2011). O toque retal é etapa essencial do exame clínico para exclusão de câncer e deve ser realizado antes da HRA, para identificação de massas firmes e extensas. Todo o canal anal pode ser examinado com esta técnica, uma vez que sua porção proximal está no máximo a 6 cm da borda anal, região do anel anorretal. O exame é precedido pela visualização direta da margem anal e da pele perianal, com o paciente podendo ser posicionado de diferentes formas – decúbitos lateral direito ou esquerdo, litotomia ou pronado. Em geral, adota-se decúbito lateral esquerdo e posição fetal (PALEFSKY, 2012).

2.1.7.2 Citologia anal

A citologia anal se tornou uma ferramenta comum na avaliação das NIAs relacionadas ao HPV, principalmente nas populações de risco. Desta forma, a otimização de sua técnica necessita de padronização para melhores resultados. Assim como na citologia cervical, a técnica para coleta do material é ponto-chave para garantir adequabilidade da amostra, com representação de toda a morfologia do epitélio. A orientação do paciente com relação ao preparo é etapa fundamental, recomendando-se evitar enemas e coito anal receptivo 24 horas antes do exame. Decúbito lateral esquerdo tem sido o posicionamento preferido, e diferentes tipos de materiais para coleta não possuem diferença demonstrada em estudos. A autocoleta pode aumentar a acessibilidade e aceitabilidade para rastreamento de NIAs, principalmente em grupos de risco. A coleta pelo médico exige um mínimo de treinamento e prática para adequabilidade do material (DARRAGH et al., 2013).

Quanto à preparação da amostra, tanto citologia em base líquida como convencional necessitam de coloração pelo método de Papanicolaou. Alguns estudos têm comparado as duas técnicas, porém sem grandes diferenças entre os resultados quando realizados por clínicos experientes (DARRAGH et al., 2013; MAIA et al., 2013). De forma geral, a sensibilidade e especificidade da citologia anal dependem do tipo de preparação, da definição dos resultados anormais e da população em estudo. Em uma revisão sistemática dos resultados de citologia anal, pacientes HIV positivos apresentam grande sensibilidade para detecção de NIA, porém com baixa especificidade (DARRAGH et al., 2013). Embora a citomorfologia anal seja similar à cervical, observam-se algumas

diferenças, como a baixa frequência de coilócitos verdadeiros e a presença de numerosas células escamosas anucleadas nos esfregaços anais.

Alterações degenerativas são mais comuns e alterações reativas e reparativas são menos comuns em amostras anais, exceto na presença de infecções por agentes como herpes vírus. As LSIL refletem a infecção pelo HPV e os achados morfológicos são alterações nucleares em células escamosas superficiais e intermediárias, incluindo aumento volumétrico, hipercromasia, alterações na cromatina e membrana nuclear irregular. Outras alterações que podem ser observadas são queratinização citoplasmática, coilócitos, bi e multinucleação (ROBERTS; EKMAN, 2012).

As HSIL se traduzem em alterações morfológicas resultantes da transcrição ativa dos genes E6 e E7, pelo HPV. Usualmente, manifestam-se como células pequenas e imaturas do tipo metaplásicas, isoladas ou em pequenos grupamentos. Observam-se hipercromasia, variações no tamanho, forma e membrana nucleares, além de aumento da relação núcleo/citoplasma. O citoplasma é variável, podendo ser denso ou queratinizado. São frequentes nas amostras anais os diagnósticos de LSIL e HSIL no mesmo esfregaço. No diagnóstico de atipias em células escamosas de significado indeterminado, não se podendo afastar lesão de alto grau (ASC-H), as alterações são sugestivas, porém não conclusivas para HSIL. O carcinoma escamoso anal é similar ao do colo uterino, com variável número de células malignas e frequentemente apresentando células queratinizadas (ROBERTS; EKMAN, 2012).

2.1.7.2.1 Citologia esfoliativa convencional

O exame citológico é prática utilizada na clínica ginecológica desde o início do século XX, quando Schauenstein (1908) e Rubin (1910) descreveram as lesões pré-cancerosas do colo uterino. Em 1928, Papanicolaou e Babés relataram a presença de células cancerosas no esfregaço de colo uterino e sugeriram a possibilidade de o método citológico vir a ser utilizado no diagnóstico do câncer do colo uterino (apud Gompel, 1997). A citologia esfoliativa convencional é realizada a partir de um esfregaço simples, colhido com escova ou espátula de madeira ou metálica, que, quando friccionadas sobre a superfície do canal anal, podem recolher células de todas as camadas do epitélio. Essas células podem fornecer informações importantes sobre eventuais lesões, permitindo não só o diagnóstico, como também o acompanhamento de pacientes previamente tratadas, no sentido de identificar possíveis recidivas. Existem também alterações citopáticas preditivas da ação viral, bem como de

lesões inflamatórias, neoplásicas e displásicas, que podem ser avaliadas por esse método (MAIA et al, 2013).

A coleta citológica convencional é de fácil execução, não agressiva e de baixo custo operacional. A baixa sensibilidade da técnica pode ser atribuída a diferentes fatores: coleta inadequada da amostra, baixa celularidade, artefatos técnicos de dessecação, material fecal, erro na técnica ou interpretação subjetiva dos achados morfológicos (MAIA et al, 2013). A taxa de falso-negativo e falso-positivo na CC anal (CC) ocorre principalmente pela falta de experiência dos patologistas. Segundo o Colégio Americano de Patologistas, de todos os casos de NIA de alto grau, apenas 65% foram diagnosticadas corretamente, contra 85% das NIC (DARRAGH et al., 2013).

2.1.7.2.2 Citologia em base líquida

A citologia em base líquida (CBL) foi proposta em 1991 por Hutchinson. Dispendiosa, é uma técnica que vem sendo utilizada por oferecer leituras mais purificadas, livres de detritos celulares e restos fecais. Esse método é considerado como importante alternativa à citologia convencional, especialmente pela menor perda celular no preparo da amostra, menor quantidade de material fecal na coleta anal e menor chance de artefatos de dessecação. As células são fixadas em meio líquido, ocorrendo preservação de proteínas, o que possibilita a análise molecular da amostra. A literatura é controversa quanto à acurácia do método. Um estudo recente revelou que a amostra cervicovaginal colhida em base líquida não demonstra aumento de sensibilidade quando comparada ao método convencional. Porém, grande parte dos estudos mostra uma queda no número de casos insatisfatórios e aumento de sensibilidade na detecção de anormalidades citológicas quando se compara CC e CBL com o exame histopatológico. Ademais, os meios líquidos possibilitam a realização de testes complementares de biologia molecular, como PCR, captura híbrida, microarrays e imunocitoquímica (SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019; MAIA et al, 2013).

Todos os pacientes com alterações citológicas deverão ser encaminhados para anoscopia (PALEFSKY, 2012).

2.1.7.3 Anoscopia de alta resolução (HRA)

A HRA é semelhante à colposcopia cervical, tendo como objetivo determinar a presença, extensão ou ausência de lesões associadas ao HPV através do exame sistemático de toda a junção

escamocolumnar, canal anal e pele perianal. Esse exame permite biópsia e até a remoção de HSIL. Palefsky et al., em 2012, demonstraram que o mesmo princípio básico da aplicação de ácido acético e lugol, utilizado no colo uterino, pode ser utilizado em toda a superfície do canal anal, detectando lesões acetobranças suspeitas a serem biopsiadas (DARRAGH et al., 2013; PALEFSKY, 2012).

O procedimento requer treinamento extensivo e experiência para obtenção melhores resultados. Existe uma longa curva de aprendizado para aquisição da prática no reconhecimento visual das mínimas alterações e coordenação no manejo do equipamento. Sua disponibilidade ainda é limitada devido ao número de médicos que o realizam, infraestrutura e treinamento requeridos, sendo reservada principalmente para a população de alto risco. O exame possui sensibilidade de 90% e uma especificidade de 19%, mas quando associado à citologia há uma melhor especificidade nos diagnósticos das lesões anais. Diante dessas limitações, até o momento, não pode ser vista como uma verdadeira ferramenta para o rastreamento (DARRAGH et al., 2013; PALEFSKY, 2012).

2.1.7.4 Métodos moleculares de detecção do DNA-HPV

Em virtude da baixa sensibilidade dos métodos morfológicos e sorológicos, a biologia molecular para detecção do HPV apresentou grandes avanços nos últimos anos. As técnicas de biologia molecular detectam diretamente o ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) dos agentes infecciosos, apresentando alta acuidade, o que permite o diagnóstico seguro (AZEVEDO et al, 2012). A detecção direta do DNA do HPV constitui o método mais confiável para identificar o vírus (MAIA et al, 2013). O FDA ainda não aprovou nenhum método molecular para a região anal (SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

2.1.7.4.1 Hibridização com Sondas (Southern blot, Dot blot e Captura Híbrida)

São métodos baseados na análise do DNA celular total. A técnica denominada Southern blot foi o primeiro método adotado. Durante muitos anos, foi considerado “padrão ouro” para a identificação do HPV, já que sua especificidade e sensibilidade são elevadas. A sensibilidade da técnica de Dot blot é menor que a de Southern blot. Os testes disponíveis comercialmente (ViraPap e ViraType) são procedimentos de Dot blot modificados. Atualmente, os kits para captura híbrida 1 e 2, produzidos pela empresa Digene, demonstram boa acurácia, sendo os mais utilizados na prática clínica (AZEVEDO et al, 2012). O sistema Digene de captura híbrida 2 para HPV de alto risco é uma

solução hibridizadora que utiliza anticorpos na captura dos híbridos que são detectados por quimioluminescência através da amplificação de sinal para detectar 13 tipos de DNA do HPV de alto risco em amostras cervicais. Os tipos de HPV detectados são: 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Esse teste não determina o subtipo específico presente no espécime clínica (AZEVEDO et al, 2012; MAIA et al., 2013; SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

2.1.7.4.2 Teste de Hibridização in situ (ISH)

Tem como objetivo investigar a presença do DNA de HPV incluído em núcleos das células infectadas, em cortes histológicos a fresco, fixados ou até em esfregaços celulares. Apesar de o ISH ser menos sensível do que o teste Blot, ele permite investigar amostras histológicas e realizar estudos retrospectivos. Assim, o ISH é técnica morfológica e molecular mista, que possibilita avaliação quantitativa, assim como a demonstração do vírus nas células neoplásicas ou normais. Portanto, poderia ser considerada a técnica de escolha para a detecção do DNA viral, mas seu elevado custo faz com que seja desaconselhada em grandes estudos (AZEVEDO et al, 2012; SIDDHARTHAN; LANCIAULT; TSIKITIS, 2019).

2.1.7.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Esse método foi desenvolvido por Mullis, em 1987. Trata-se de técnica enzimática sofisticada que possibilita a amplificação em um milhão de vezes das sequências de DNA na amostra do exame. Pode ser aplicada em DNA extraído de tecido fresco ou fixado. Atualmente, é a técnica mais sensível de que se dispõe. Pode ser processada rapidamente (2-3 horas), porém requer habilidade acurada e deve ser realizada em laboratórios que disponham de meios especializados de contenção, a fim de se prevenir a contaminação da amostra previamente amplificada. Tal contaminação pode levar a resultados falso-positivos. A tecnologia da reação em cadeia da polimerase é flexível, permitindo modificações que possibilitam seu emprego na análise de grande variedade de amostras. Entre as principais técnicas resultantes de modificações da reação em cadeia da polimerase, pode-se citar o RT-PCR, nested PCR, multiplex PCR, PCR a partir de primers randômicos e PCR em tempo real. Esse método é, atualmente, mais aplicado em pesquisas (AZEVEDO et al, 2012).

2.1.7.4.4 Chipes de DNA

Microarrays de DNA, chipe de DNA, chipe biológico ou biochipe são os nomes dados à mais nova tecnologia para análise dos ácidos nucleicos. Consiste em lâminas de vidro nas quais fragmentos de fita única (sondas) são fixados e imobilizados de forma ordenada e específica, chamadas células de sondas, que contêm milhões de cópias de um segmento gênico em particular. O princípio baseia-se na propriedade de hibridização por complementaridade dos ácidos nucleicos. É um método diagnóstico por genotipagem, realizado *in vitro*, que é capaz de identificar qualitativamente e semiquantitativamente 24 subtipos de HPV, sendo 6 de baixo risco e 18 de alto risco (ZHU et al., 2019; LEVI et al., 2019). O PAPILOCHECK® é um método disponibilizado comercialmente que utiliza essa tecnologia (REUSCHENBACH et al., 2010).

2.1.7.5 Imunocitoquímica

A realização de imunocitoquímica tem sido pesquisada, na tentativa de melhorar a sensibilidade do exame cervicovaginal (SCHMIDT et al., 2011). Poucos estudos focaram outros sítios além da cérvice uterina, mostrando similaridade na biologia associada ao HPV. A maioria dos trabalhos prévios utilizou o anticorpo p16INK4a (p16), marcador de células displásicas e carcinoma, mostrando que seu uso, quando feito na mesma lâmina do esfregaço corado pelo Papanicolaou, potencializa a sensibilidade do exame (SCHMIDT et al., 2011). A expressão do p16 está fortemente associada a alterações displásicas de alto grau, com cerca de 99% de concordância, refletindo a ativação do E6/E7 (SCHMIDT et al., 2011; IKENBERG et al., 2013). Dentre os biomarcadores usados para definição de lesões associadas ao HPV, somente ele foi reconhecido no contexto da biologia do HPV. O ProEx C e o Ki67 possuem dados insuficientes na literatura para serem recomendados de forma independente para detecções das lesões associadas ao HPV (IKENBERG et al., 2013).

Estudos recentes têm sugerido que a genotipagem do HPV é mais sensível, mas menos específica do que a dupla marcação por p16/Ki67 para a detecção de HSIL no rastreamento de lesões precursoras de câncer do canal anal. Dessa forma, trata-se de ferramenta promissora no manejo dessas patologias (PICHON et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade de dupla marcação imunocitoquímica para p16/Ki67 em amostras de citologia esfoliativa em base líquida no rastreio de lesões precursoras de câncer do canal em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a morfologia das alterações citológicas e a aplicação dos critérios de Bethesda nas lesões intraepiteliais anais.

Relacionar os HPV de baixo e alto risco com as lesões intraepiteliais anais, por meio de esfregaços citológicos e tipagem viral por genotipagem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO E PACIENTES

Trata-se de estudo comparativo, utilizando amostras coletadas pelos pesquisadores do Hospital Universitário de Brasília (HUB) MAIA, et al., 2013, constituídas por lâminas de citologia e fragmentos teciduais emblocados em parafina, disponibilizados em banco de dados da Unidade de Anatomia Patológica do referido hospital. Após concordarem com a participação no estudo, os participantes foram esclarecidos sobre o termo de consentimento (Apêndice A) e o assinaram, responderam à entrevista para preenchimento do questionário que abordava as características clínico-epidemiológicas (Apêndice B) e foram submetidos a exame clínico. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília de número CEP-FM 062-2008 (Apêndice C).

As citologias em base líquida de amostras anais de 33 homens e mulheres infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), sem lesões visíveis detectadas ao exame externo, foram avaliadas por imunocitoquímica usando uma interpretação independente de morfologia, com dupla marcação para p16/Ki67 e pelo teste de PapilloCheck® para detecção de HR-HPV. A biópsia de 01 paciente desse grupo foi submetida a exame imuno-histoquímico utilizando o mesmo marcador.

4.2 CITOLOGIA, ANUSCOPIA E BIÓPSIA

MAIA, et al., 2013, coletaram amostras primeiramente para citologia e então para biologia molecular. A técnica de coleta consistia em introduzir uma escova endocervical comum por 4 cm no canal anal e girá-la 180 graus (NADAL et al, 2009). As amostras foram transferidas para o meio de fixação PreservCyt e as lâminas foram preparadas em processador ThinPrep 2000 (Hologic, Bedford, Massachusetts, EUA), sendo posteriormente coradas pelo método Papanicolau. Os achados citológicos foram classificados de acordo com os critérios de Bethesda de 2001, utilizando categorias: negativas para malignidade; células escamosas atípicas de significado indeterminado - possivelmente não neoplásicas (ASC-US); lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL); células escamosas atípicas - não se pode afastar lesão de alto grau (ASC-H); lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e carcinoma invasivo (SOLOMON et al., 2002; ROBERTS; EKMAN, 2012). Após a coleta

de espécimes, todos os pacientes foram submetidos a HRA, sendo realizadas biópsias quando alterações foram identificadas.

4.3 DETECÇÃO DE HPV USANDO MICROARRAYS

Um kit de PAPILOCHECK® (GREINER BIO-ONE) foi usado para análise molecular usando microarrays, no Laboratório de Anatomia Patológica da UnB. A técnica de coleta foi a mesma utilizada para a citologia e a amostra foi transferida para o meio de coleta fornecido pelo fabricante. O kit PAPILOCHECK® detecta 24 subtipos de HPV, 6 dos quais são de baixo risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 55) e 18, alto risco (16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 68, 73, 82, 53, 66, 70). Os resultados positivos foram aqueles com uma carga viral (relação sinal/ruído [SNR]) superior a 20. Os resultados são expressos qualitativa e semiquantitativamente para os 24 tipos de HPV de baixo e alto risco, simultaneamente. Os valores de SNR abaixo de 100 indicam um pequeno número de cópias virais por pilha, que podem ser um sinal da infecção inicial ou de remissão espontânea. Altos valores de SNR sugerem uma maior probabilidade de recorrência ou infecção persistente (PAPILOCHECK, 2016).

4.4 IMUNOCITOQUÍMICA

As lâminas citológicas, previamente coradas pelo método Papanicolaou, foram descoradas usando xilol, álcool, álcool-ácido e água, e então submetidas ao procedimento de imunomarcção utilizando o kit CINTec PLUS® (MTM Labs, Heidelberg, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, no Laboratório de Anatomia Patológica da UnB. O kit contém um coquetel de anticorpos primários que compreende um anticorpo monoclonal de camundongos (clone E6H4) dirigido contra a proteína humana p16 e um anticorpo monoclonal de coelho (clone 274-11 AC3) dirigido contra a proteína humana Ki67. As conversões do cromogênio 3,30-diaminobenzidina, mediada por peroxidase, e a do cromogênio vermelho, mediada por fosfatase alcalina, resultam em manchas marrons e vermelhas nos locais de antígenos p16 e Ki67, respectivamente. Todas as lâminas coradas foram avaliadas de forma independente por dois citopatologistas, que desconheciam os

diagnósticos citológicos, histológicos e os resultados dos testes de HPV, na Unidade de Anatomia Patológica do HUB. As amostras foram classificadas como positivas quando p16 e Ki67 foram coexpressos na mesma célula (coloração marrom citoplasmática para p16 e vermelha nuclear para Ki67). De acordo com a instrução do fabricante, uma única célula com dupla marcação é suficiente para classificar a amostra como positiva (WOLFF, 2017).

4.5 IMUNOISTOQUÍMICA

HRA e biópsia foram realizadas no caso de HSIL anal, utilizando pinça. A imunomarcação do kit CINtec PLUS® foi aplicada à amostra, de acordo com as instruções fabricante.

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Foram analisadas e comparadas as proporções de resultados positivos e negativos do CINtec PLUS® e do PAPILLOCHECK® em relação aos diagnósticos citológicos e histológicos. Aplicou-se Teste de Fisher para avaliar a associação entre positividade simultânea de imunocitoquímica e biologia molecular, bem como negatividade em ambos os testes, e os resultados citológicos, objetivando-se $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Dos 33 casos estudados, 18 (54,55%) tiveram alterações à citologia (ASC-US, n=5; LSIL, n=10; ASC-H, n=2; HSIL, n=1) e 15 casos (45,45%) foram negativos, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 Coexpressão de p16/Ki67 e detecção de HR-HPV de acordo com os resultados de citologia e biópsia

	Citologia					Total	Biópsia			Total
	Negativo n=15	ASC-US n=5	ASC-H n=2	LSIL n=10	HSIL n=1		Negativo n=1	LSIL n=7	HSIL n=1	
p16/Ki67 - HR-HPV+	6	1	1	8	0	16	0	5	0	5
p16/Ki67 - HR-HPV-	9	1	0	1	0	11	1	1	0	2
p16/Ki67 + HR-HPV+	0	1	1	1	1	4	0	1	1	2
p16/Ki67 + HR-HPV-	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0

Dos 18 casos com citologia alterada, a coexpressão de p16/Ki67 foi observada em 6 casos (33,33%). As amostras de citologia p16/Ki67 positivas (p16/Ki67+) mostraram aglomerados de células duplamente coradas, sendo as positivas células atípicas (células imaturas com cariomegalia) (Figura 1). Na biópsia com HSIL, células duplamente coradas foram observadas em toda a espessura do epitélio (Figura 2).

Figura 1. Coexpressão de p16/Ki67 em citologia anal. Aglomerados de células duplamente marcadas (citoplasma marrom para p16 e núcleo em vermelho para Ki67). Imunocitoquímica, 400x.
Fonte: Próprio autor.

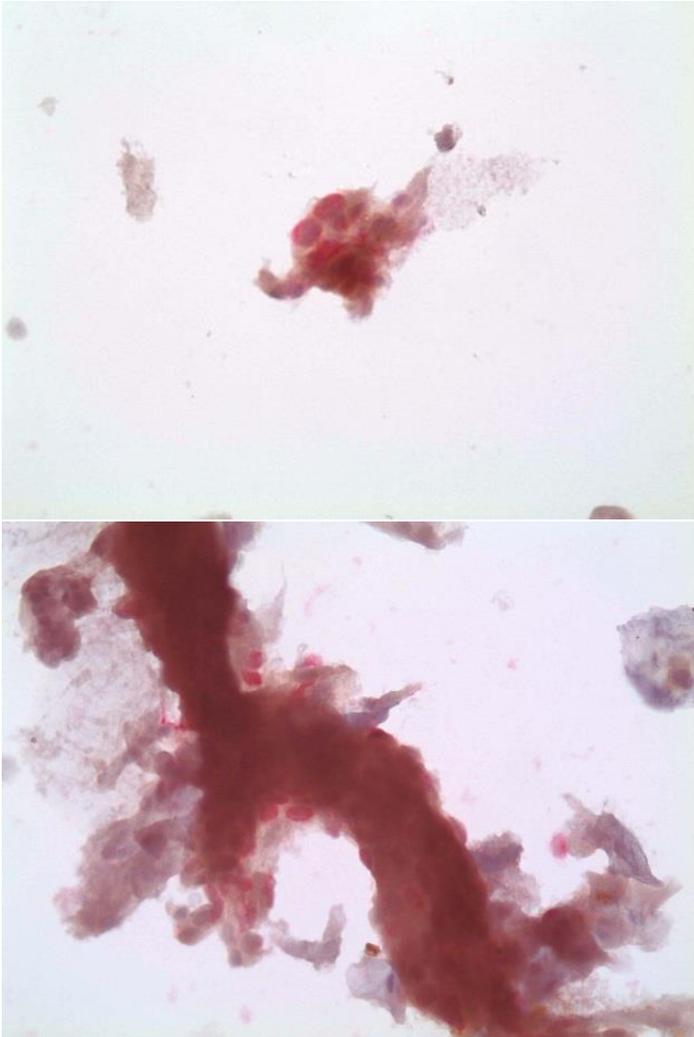
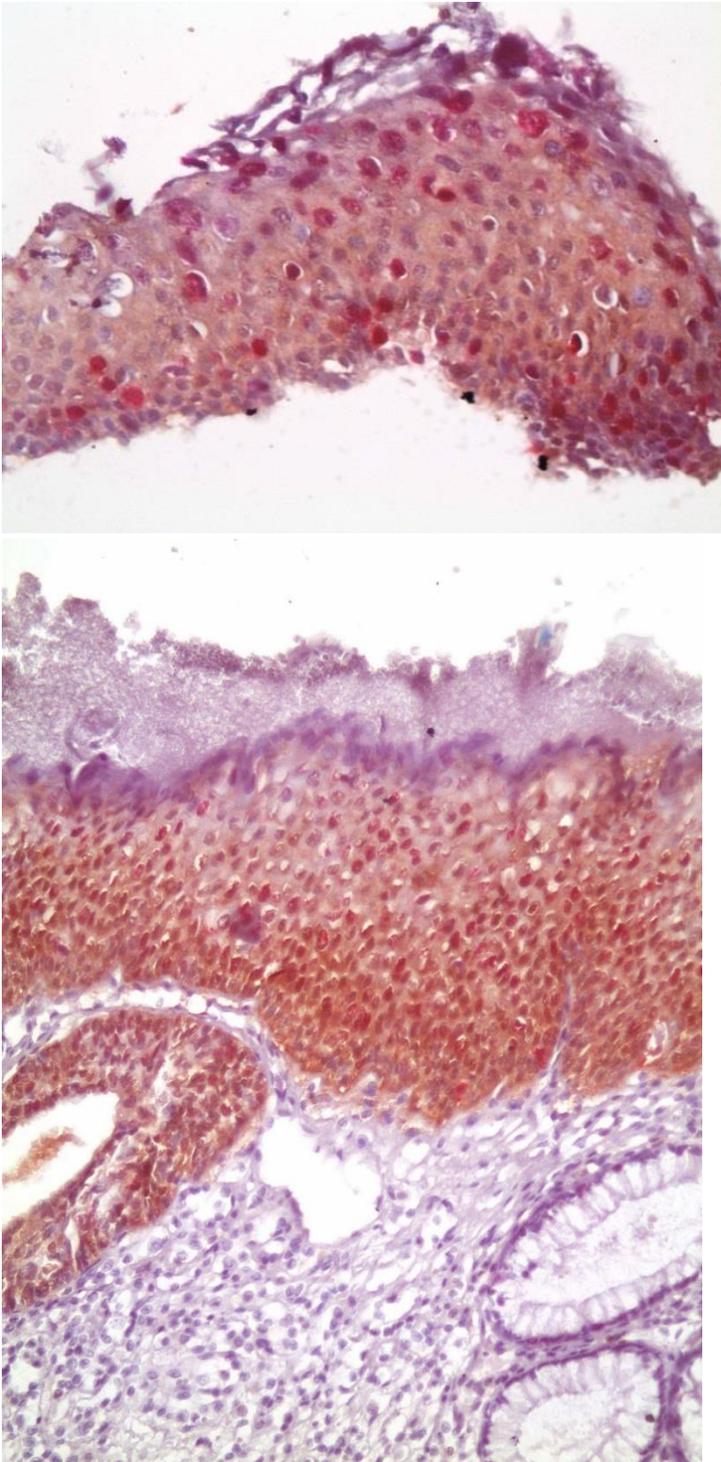


Figura 2. Coexpressão de p16/Ki67 em biópsia anal. HSIL com células duplamente marcadas (citoplasma marrom para p16 e núcleo em vermelho para Ki67) em toda a espessura do epitélio. Imunoistoquímica, 200x. Fonte: Próprio autor.



Dos 33 casos, foi detectado HR-HPV em 20 casos (60,6%), sendo 14 (70%) com citologia alterada e 6 (30%) sem alterações à citologia. Os resultados da citologia e da biópsia de acordo com a expressão p16/Ki67 e a detecção de HR-HPV são mostrados na Tabela 1.

Entre todos os casos analisados, o estado negativo para p16/Ki67 e positivo para HR-HPV (p16/Ki67- HR-HPV+) foi observado em 16 amostras (48,48%). A maioria delas (62,5%, 10/16) teve anormalidades citológicas (ASC-US, n=1; ASC-H, n=1, LSIL, n=8). O diagnóstico de NIA-1 foi confirmado na biópsia de três pacientes com diagnóstico citológico de LSIL e em um paciente diagnosticado com ASC-H; não foram observadas lesões na HRA dos outros pacientes e a biópsia não foi realizada. Em um paciente com p16/Ki67- HR-HPV+, a citologia foi negativa, mas à HRA uma lesão foi detectada e biopsiada, com o diagnóstico de NIA-1. Nos cinco pacientes restantes com status p16/Ki67- HR-HPV+ (31,25%), tanto a citologia quanto a HRA foram negativas.

Onze casos (33,33%) foram negativos para p16/Ki67 e também para HR-HPV (p16/Ki67- HR-HPV-). Majoritariamente (81,81%, 9/11), esses pacientes apresentaram citologia negativa, entretanto duas lesões foram observadas à HRA, com os seguintes diagnósticos às biópsias: NIA-1 e normal. Apenas duas amostras p16/Ki67- HR-HPV- tinham anormalidades citológicas (ASC-US, n=1; LSIL, n=1). Não foram observadas lesões à HRA desses pacientes e a biópsia não foi realizada.

Os pacientes com marcação positiva para p16/Ki67 e para HR-HPV (p16/Ki67+ HR-HPV+) corresponderam a 12,12% (4/33) dos casos e todas as suas amostras exibiram anormalidades citológicas: ASC-US, n=1; LSIL, n=1; ASC-H, n=1; HSIL, n=1. Os pacientes com LSIL e HSIL tiveram os diagnósticos confirmados por biópsia. Nenhuma lesão foi observada à HRA nos casos com ASC-US e ASC-H, e a biópsia não foi executada.

Aplicou-se Teste de Fisher para avaliar a associação entre resultados p16/Ki67+ HR-HPV+, p16/Ki67- HR-HPV- e alterações à citologia. Conforme consta na Quadro 1, observou-se significância estatística ($p=0,01$).

Quadro 1. Associação entre imunocitoquímica para p16/Ki67 e teste de HR-HPV com resultados da citologia em base líquida

	Citologia alterada	Citologia normal	p-value*
p16/Ki67 + HPV+	4	0	0,01
p16/Ki67 - HPV-	2	9	

*exato de Fisher.

As amostras com status positivo para p16/Ki67 e negativo para HR-HPV (p16/Ki67+ HR-HPV-) corresponderam a 6,06% (2/33) do total. Os dois casos foram diagnosticados à citologia como ASC-US. Não foram observadas lesões à HRA desses pacientes e a biópsia não foi indicada.

6 DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE DOS DADOS

Uma correlação pobre entre as classes citológicas e histológicas de lesões pré-neoplásicas anais foi observada, uma vez que a citologia subestima a classe de displasia comparada à biópsia correspondente. Diversos fatores são responsáveis por esta discrepância e o método de coleta desempenha importante papel. CBL são preferíveis às CC por apresentarem um fundo mais limpo, permitindo maior destaque às células atípicas e possibilitando sua identificação. A adequabilidade do material não pode ser negligenciada, e assim como na citologia cervical, células da zona de transformação (colunares ou metaplásicas) devem estar presentes para considerar a amostra satisfatória. Uma boa celularidade é essencial, e está diretamente relacionada à obtenção de resultados mais acurados. O Sistema de Bethesda recomenda uma celularidade mínima de 2.000 – 3.000 células escamosas nucleadas por amostra para que o espécime seja considerado satisfatório. Isso equivale a uma a duas células escamosas nucleadas por campo com aumento de 40x na CBL utilizando ThinPrep ou três a seis células escamosas nucleadas por campo com aumento de 40x na CBL com SurePath (BETANCOURT, et al., 2013).

Como a interpretação da coexpressão de p16/Ki67 é independente da citomorfologia e a positividade para p16/Ki67 está significativamente associada ao aumento do grau das lesões do colo uterino, essa técnica tem o potencial de fornecer um método mais objetivo para a triagem das NIAs. IKENBERG, et al., 2013, no Grupo de Estudo PALMS, mostraram que os índices de positividade da dupla marcação para p16/Ki67 na citologia cervical foram comparáveis à prevalência de resultados anormais ao exame citológico de rotina com Papanicolaou, enquanto o teste de DNA-HPV obteve menos de 50%. Em mulheres de todas as idades, a dupla marcação imunocitoquímica foi mais sensível do que a citologia por Papanicolaou (86.7% versus 68.5%; $P < .001$) para detectar NIC-2 e NIC-3, com especificidade semelhante (95.2% vs 95.4%; $P = .15$). O teste para detecção de DNA-HPV em mulheres com 30 anos ou mais foi mais sensível do que o CINtecPLUS 30 (93.3% vs 84.7%; $P = .03$), entretanto menos específico (93.0% vs 96.2%; $P < .001$). Os resultados sugeriram um potencial papel da dupla marcação para p16/Ki67 em citologias cervicais, no rastreamento de lesões precursoras, especialmente em mulheres mais jovens, nas quais os testes para DNA-HPV apresentam limitações.

No presente estudo, a marcação com CINtec PLUS® foi realizada em amostras de citologia e biópsia anais. A dupla expressão de p16/Ki67 foi observada em 18,18% (6/33) das amostras citológicas e todas essas amostras apresentaram anormalidades citológicas (ASC-US, n=3; LSIL, n=1; ASC-H, n=1; HSIL, n=1). O diagnóstico citológico das amostras com LSIL e HSIL foi confirmado por biópsia, mas nenhuma lesão foi observada à HRA dos pacientes com ASC-US e ASC-H e a biópsia não foi executada.

A coexpressão de p16/Ki67 foi observada em uma amostra com diagnóstico histológico de HSIL, entretanto apenas uma das sete diagnosticadas como LSIL foi positiva para p16/Ki67. Não foi identificada marcação por p16/Ki67 nas amostras com citologia negativa. De acordo com estudo anterior a respeito de lesões cervicais, nenhum dos casos normais à citologia foi positivo para dupla marcação, enquanto a proporção de casos p16/Ki67 positivos aumentou significativamente com a gravidade do diagnóstico histológico, sendo de 39,4% entre os casos com diagnóstico NIC-1, 70,8% em NIC-2 e 86,5% em NIC-3 e carcinoma de células escamosas. Similarmente, o aumento da porcentagem de amostras com marcação positiva para p16/Ki67 também está associado ao aumento da gravidade da NIA (DARRAGH, et al., 2013; WENTZENSEN, et al., 2012; ZHU et al., 2019).

Em amostras cervicais, o p16/Ki67 é expressivamente mais específico quando comparado ao Ki67 ou ao p16 sozinhos e ao teste de HPV para a detecção de HSIL subjacente ou subsequente a diagnósticos de células escamosas atípicas de significado indeterminado e LSIL (IKENBERG, et al., 2013; ZHU et al., 2019).

Neste trabalho, nenhum paciente com células p16/Ki67 positivas e com diagnóstico de ASC-US e ASC-H apresentou lesão à HRA, entretanto, considerando a possibilidade de desenvolvimento de uma HSIL subsequente, esses pacientes devem ser acompanhados, principalmente aqueles com HR-HPV. Em um estudo com 256 mulheres HIV positivas nos EUA, STIER et al., 2019, identificaram que 41% das pacientes com citologias anais normais ou com diagnóstico de ASC-US tinham, na verdade, HSIL. Na metodologia utilizada, todas as pacientes foram submetidas a citologia, HRA e biópsias das áreas mais suspeitas, evidenciando uma prevalência de HSIL de 27%, a maior já reportada na literatura. Os autores defendem que estudos anteriores subestimaram esse número pois só encaminharam para HRA e biópsia pacientes com exames citológicos alterados.

A maioria das amostras de citologia anal (48,48%) estudadas foi p16/Ki67- HR-HPV+. O expressivo número de pacientes portadores de HR-HPV pode ser explicado pela alta prevalência desse tipo viral em amostras anais de pacientes HIV positivos (STIER et al., 2019; DIETRICH, et al., 2015).

Não foi evidenciada expressão de p16/Ki67 em amostras negativas à citologia, porém os subtipos de HR-HPV de alto risco foram detectados em 42,85% delas, sugerindo maior especificidade da coexpressão de p16/Ki67 quando comparada ao teste para pesquisa de HR-HPV. No entanto, em amostras com anormalidades citológicas, a expressão de p16/Ki67 foi muito baixa (33,33%) quando comparada à positividade para HR-HPV (77,77%), indicando sensibilidade mais baixa. PICHON, et al., 2019, encontraram resultados semelhantes em pacientes com diagnóstico de ASC-US. Em seu estudo, a genotipagem para HPV foi mais sensível, porém menos específica do que a imunomarcação para p16/Ki67 na detecção de HSIL.

Os critérios para a interpretação da positividade do CINtec PLUS® incluem dupla expressão em até mesmo única célula, independente da citomorfologia. Neste estudo, a maioria das amostras positivas de citologia, quando submetidas à imunomarcação por p16/Ki67, evidenciou aglomerados de células duplamente coradas, sendo as células positivas, em grande parte, morfologicamente atípicas, diminuindo assim o potencial de uma falsa interpretação positiva. Tal fato se traduz na alta especificidade do método para detectar lesões precursoras de cânceres relacionados ao HPV, como indicado por PICHON, et al., 2019 e ZHU, et al., 2019.

6.2 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Estudos comparativos apresentam baixa capacidade de generalização, entretanto sugerem explicações para as variações de frequência, servindo de base para pesquisas posteriores sobre o tema, constituindo-se numa primeira etapa para formulação de hipóteses (BONITA; BEAGLEHOLE; KJELLSTRÖM, 2008).

A despeito de vários trabalhos demonstrarem o benefício do rastreamento precoce do câncer anal, ainda não há estudos randomizados, o que torna controversas as estratégias de rastreamento, seguimento e tratamento das lesões intraepiteliais anais. Uma limitação importante é o viés de seleção. O recrutamento foi feito com base na demanda de pacientes que foram atendidos no ambulatório de infectologia e que aceitaram a participação no estudo. Assim, a distribuição das variáveis pode não refletir a real proporção de pacientes que são atendidos no serviço.

Vieses de aferição podem ocorrer em todas as fases da análise. As coletas das amostras, apesar da padronização das sequências, podem sofrer influências de diversos fatores, como desconforto ao exame, dor, sangramento e material fecal em excesso.

A variabilidade nas análises das amostras entre diferentes patologistas também é fator limitante, uma vez que citologias anais são incomuns na prática diária. Da mesma forma, os resultados obtidos pela anoscopia dependem da experiência e treinamento do operador.

Trata-se de estudo com amostra pequena e é sabido que conclusões oriundas de análise de eventos observados em menos de 10% da casuística apresentam baixo poder estatístico (BONITA; BEAGLEHOLE; KJELLSTRÖM, 2008). Assim, os resultados referentes às variáveis de baixa frequência devem ser analisados com cautela.

7 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a imunomarcção por p16/Ki67 pode ser útil para melhorar a especificidade da citologia na detecção de lesões intraepiteliais escamosas anais de alto grau.

1. Os achados citomorfológicos evidenciados às citologias anais são similares àqueles encontrados nos estudos referentes às citologias cervicais, tornando possível a aplicação dos critérios de Bethesda para citologia anal.

2. Os diagnósticos citológicos e histológicos foram divergentes, sendo que os achados citológicos subestimaram as alterações histológicas.

3. O teste genético para HPV de alto risco foi positivo na maioria dos casos com citologia alterada, identificando sua presença mesmo quando os resultados citológicos foram normais.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, AEB et al. Association between human papillomavirus infection and cytological abnormalities during early follow-up of invasive cervical cancer. **Journal of medical virology**, v. 84, n. 7, p. 1115-1119, 2012.

AZEVEDO, AEB. Papillomavirus Humano (HPV) e sua associação com alterações citológicas no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 2012.

BETANCOURT, EM et al. Anal cytology as a predictor of anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive men and women. **Diagnostic cytopathology**, v. 41, n. 8, p. 697-702, 2013.

BONITA, R; BEAGLEHOLE, R; KJELLSTRÖM, T. **Epidemiologia básica**. OPS, 2008.

DARRAGH, TM 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. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 32, n. 1, p. 76-115, 2013.

DARRAGH, TM. et al. Interrater agreement of anal cytology. **Cancer cytopathology**, v. 121, n. 2, p. 72-78, 2013.

DARRAGH, TM.; WINKLER, B. Anal cancer and cervical cancer screening: key differences. **Cancer cytopathology**, v. 119, n. 1, p. 5-19, 2011.

DE VUYST, H et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **International journal of cancer**, v. 124, n. 7, p. 1626-1636, 2009.

DEFAYETTE, DN; GLENN, LL. Human papillomavirus and cervical cancer knowledge. **Gender medicine**, v. 9, n. 4, p. 292; author reply 293, 2012.

DIETRICH, A et al. Human papillomavirus status, anal cytology and histopathological outcome in HIV-positive patients. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 10, p. 2011-2018, 2015.

DURAES, LC; SOUSA, JB. Câncer anal e doenças sexualmente transmissíveis: qual a correlação?. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p. 265-268, Aug. 2010.

IKENBERG, H et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 20, p. 1550-1557, 2013.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. **Tipos de câncer** [Internet]., 2018 Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-anal>. Acesso em: 20 de setembro de 2019

- JOHNSON, LG et al. Anal cancer incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results experience, 1973–2000. **Cancer**, v. 101, n. 2, p. 281-288, 2004.
- LEEDS, IL.; FANG, SH. Anal cancer and intraepithelial neoplasia screening: a review. **World journal of gastrointestinal surgery**, v. 8, n. 1, p. 41, 2016.
- LEVI, JE et al. High-Risk HPV Testing in Primary Screening for Cervical Cancer in the Public Health System, Sao Paulo, Brazil. **Cancer Prevention Research**, v. 12, n. 8, p. 539-546, 2019.
- LONG, KC et al. Screening, surveillance, and treatment of anal intraepithelial neoplasia. **Clinics in colon and rectal surgery**, v. 29, n. 01, p. 057-064, 2016.
- MACHALEK, DA et al. Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. **The lancet oncology**, v. 13, n. 5, p. 487-500, 2012.
- MAIA, LB et al. Value of human papillomavirus typing for detection of anal cytological abnormalities. **Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS**, v. 34, n. 2, p. 102, 2013.
- MAIA, LB. Estudo comparativo entre os exames de citologia esfoliativa convencional e em base líquida para o rastreamento de lesões intraepiteliais anais associadas à infecção pelo papilomavírus humano em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, 2013.
- MARGARET A et al. HPV infection, anal intra-epithelial neoplasia (AIN) and anal cancer: current issues. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 398, 2012.
- MÜNGER, K et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **Journal of virology**, v. 78, n. 21, p. 11451-11460, 2004.
- NADAL, SR et al. How deep must the brush be introduced in the anal canal for a more effective cytological evaluation?. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 749-751, 2009.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIC). Cancer Stat Facts [Internet], 2019. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/anus.html>. Acesso em: 20 de setembro de 2019
- NIELSEN, A; MUNK, C; KJAER, SK. Trends in incidence of anal cancer and high-grade anal intraepithelial neoplasia in Denmark, 1978–2008. **International journal of cancer**, v. 130, n. 5, p. 1168-1173, 2012.
- PALEFSKY JM. Practicing high-resolution anoscopy. **Sexual health**, v. 9, n. 6, p. 580-586, 2012.
- PANDEY, P. Anal anatomy and normal histology. **Sexual health**, v. 9, n. 6, p. 513-516, 2012.

PapilloCheck®. **Instructions For Use PapilloCheck Test Kit**. 2016. Disponível em: https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/IFU_Instructions_for_Use/IFU_Diagnosics/PapilloCheck/PapilloCheck288/IFU_PapilloCheck_288_E_BQ-361-01.pdf

PICHON, M et al. Evaluation of p16/Ki-67 dual staining compared with HPV genotyping in anal cytology with diagnosis of ASC-US for detection of high-grade anal intraepithelial lesions. **Journal of Cytology**, v. 36, n. 3, p. 152, 2019.

PIROG, EC et al. P16/CDKN2A and Ki-67 enhance the detection of anal intraepithelial neoplasia and condyloma and correlate with human papillomavirus detection by polymerase chain reaction. **The American journal of surgical pathology**, v. 34, n. 10, p. 1449-1455, 2010.

PIRTEA, L et al. p16/Ki-67 dual staining has a better accuracy than human papillomavirus (HPV) testing in women under 30 years old. **Bosnian journal of basic medical sciences**, 2019.

REUSCHENBACH M et al. Performance of p16INK4a-cytology, HPV mRNA, and HPV DNA testing to identify high grade cervical dysplasia in women with abnormal screening results. **Gynecologic oncology**, v. 119, n. 1, p. 98-105, 2010.

ROBERTS, JM; EKMAN, D. The reporting of anal cytology and histology samples: establishing terminology and criteria. **Sexual health**, v. 9, n. 6, p. 562-567, 2012.

ROBERTS, JR.; SIEKAS, LL.; KAZ, AM. Anal intraepithelial neoplasia: A review of diagnosis and management. **World journal of gastrointestinal oncology**, v. 9, n. 2, p. 50, 2017.

SCHMIDT, D et al. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. **Cancer cytopathology**, v. 119, n. 3, p. 158-166, 2011.

SCHOLEFIELD, JH.; et al. Malignant transformation of high-grade anal intraepithelial neoplasia. **British Journal of Surgery: Incorporating European Journal of Surgery and Swiss Surgery**, v. 92, n. 9, p. 1133-1136, 2005.

SERRANO-VILLAR, S et al. Screening for precancerous anal lesions with P16/Ki67 immunostaining in HIV-infected MSM. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0188851, 2017.

SHIA, J. An update on tumors of the anal canal. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 134, n. 11, p. 1601-1611, 2010.

SIDDHARTHAN, RV.; LANCIAULT, C; TSIKITIS, VL. Anal intraepithelial neoplasia: diagnosis, screening, and treatment. **Annals of gastroenterology**, v. 32, n. 3, p. 257, 2019.

SOLOMON, D et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **Jama**, v. 287, n. 16, p. 2114-2119, 2002.

STEELE, SR et al. Practice parameters for anal squamous neoplasms. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 55, n. 7, p. 735-749, 2012.

STIER, EA et al. Prevalence of and Risk Factors for Anal High-grade Squamous Intraepithelial Lesions in Women Living with Human Immunodeficiency Virus. **Clinical Infectious Diseases**, 2019.

TONG, WWY et al. Progression to and spontaneous regression of high-grade anal squamous intraepithelial lesions in HIV-infected and uninfected men. **Aids**, v. 27, n. 14, p. 2233-2243, 2013.

UIJTERWAAL, MH et al. Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: Baseline and longitudinal data. **International journal of cancer**, v. 136, n. 10, p. 2361-2368, 2015.

WASSERMAN, P; RUBIN, DS.; TURETT, G. anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected men who have sex with men: is screening and treatment justified?. **AIDS patient care and STDs**, v. 31, n. 6, p. 245-253, 2017.

WATSON, AJM et al. Malignant progression of anal intra-epithelial neoplasia. **ANZ journal of surgery**, v. 76, n. 8, p. 715-717, 2006.

WENTZENSEN, N et al. Human papillomavirus genotyping, human papillomavirus mRNA expression, and p16/Ki-67 cytology to detect anal cancer precursors in HIV-infected MSM. **AIDS (London, England)**, v. 26, n. 17, p. 2185, 2012.

WHO. **HIV/AIDS Key Facts** [Internet], 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. Acesso em 26 de novembro de 19.

WOLFF M. CINtec PLUS Immunocytochemistry Effective Triage Tool for Cervical Cancer Screening. 2017. Disponível em: http://nordiqc2017.dk/wp-content/uploads/Roche_NordiQC2017_Abstract.pdf Acesso em: 26 de novembro de 2019

ZHU, Y 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**, v. 19, n. 1, p. 271, 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Aprovação do CEP



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 062/2008.

Título: “Estudo comparativo entre os exames de citologia esfoliativa convencional e em meio líquido para rastreamento de lesões intra-epiteliais anais associadas à infecção pelo papiloma vírus humano em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humano (HIV).”

Pesquisador Responsável: Livia Bravo Maia.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 12/09/2008.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 17/09/2008.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 25/03/2009.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** “ad referendum”, conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.
3. Recomenda-se que seja evitada qualquer forma de dirigismo ou indução do paciente no sentido de realizar o procedimento.

Brasília, 02 de Abril de 2009.

Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina UNB

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido

I-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, identidade nº _____, nascido em ____/____/____, residente em _____, declaro ter lido, ouvido e concordado com este documento. Eu aceito me submeter à colheita do material para exame citológico, a qual será feita por meio da fricção de uma escova, sobre a mucosa anal, a fim de que as células descamem. O exame será feito nos ambulatórios de DST/AIDS do HUB. Tal exame permitirá detecção precoce da lesão intra-epitelial anal (lesão precursora do câncer anal) da qual posso ser portador(a). Tenho também conhecimento de que ele será utilizado na pesquisa científica nominada *Estudo comparativo entre os exames de citologia esfoliativa convencional e em meio líquido para o rastreamento de lesões intra-epiteliais anais associadas à infecção pelo papillomavirus humano em pacientes portadores o vírus da imunodeficiência.*

Sei que sou portador(a) do vírus da imunodeficiência humana (HIV), e necessito de exames complementares para rastreamento de lesões precursoras do câncer anal, para posterior tratamento e sei também que o presente exame é necessário para ajudar a esclarecer e confirmar o precocemente o diagnóstico. Sou totalmente voluntário a realização desse procedimento mesmo sabendo que não possuo nenhuma lesão externa. Tenho conhecimento de que a colheita poderá ser desconfortável. É um exame simples e rápido e não oferece nenhum risco à minha saúde. Eu sei também, que meu exame será confirmado pela biologia molecular, que é o método mais sensível para a confirmação e determinação do tipo viral. Caso haja indicação clínica de realizar uma biópsia, concordarei com o procedimento para confirmação diagnóstica.

Fui esclarecido(a) que serei atendido(a) por médicos dos ambulatórios de origem e que a colheita citológica será realizada por um médico anatomopatologista que participa do curso de doutorado da Faculdade de Medicina – UNB., acompanhada pelos seus professores. Sei que ela me atenderá, esclarecerá todas as minhas dúvidas, e que, dependendo do resultado dos exames realizados, será proposto o tratamento, o qual será executado pela equipe técnica dos Ambulatórios – UNB, com orientação dos professores, ou por outras clínicas do HUB, caso seja necessário.

Autorizo que sejam providenciadas minhas fichas clínicas e que sejam realizados todos os exames clínicos e complementares necessários para a elaboração do diagnóstico. Autorizo também que meus dados sejam utilizados para estudo e aprendizado, atividades e publicações científicas, tanto no país como no exterior, respeitada toda a legislação vigente em relação ao assunto. Toda informação do meu caso será sempre confidencial e sigilosa. Não terei nenhum gasto financeiro.

Participo da pesquisa por minha vontade e fui esclarecido de que poderei recusar a participar ou desistir a qualquer momento, sem qualquer prejuízo. Qualquer dúvida posso ligar para Dra. Livia Bravo Maia, telefone (61)-34485499.

Brasília DATA:.....

Assinatura do Médico.....

Assinatura da Paciente ou Representante ou Responsável.....

TESTEMUNHA.....

Em caso de desistência do paciente em continuar participando da pesquisa:

Revogo o consentimento prestado no dia..... e afirmo que não desejo prosseguir no tratamento que me foi proposto, que dou como finalizado nesta data.

CIDADE: Brasília DATA:.....

Assinatura do Médico.....

Assinatura da Paciente ou Representante ou Responsável.....

TESTEMUNHA.....

APÊNDICE C – Questionário de coleta de dados

APÊNDICES

9.1 APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO

1-Sexo: () feminino () masculino

2- Idade: ____ anos

3- Ausência de lesão anal externa () sim () não

4-Estado imunitário (dosagem de CD4): ____ /mm³

5-Tempo de infecção pelo HIV: _____ anos

6-Uso de terapia ARV: () sim () não

7- Pratica coito anal: () sim () não

8-Quando iniciou o coito anal: _____ anos

9- Número de parceiros/ano: _____

10-Tabagismo: () sim () não

11- Etilismo: () sim () não

APÊNDICE D - Manuscrito**Expression of p16/Ki-67 in anal samples of HIV-infected patients**

Running head: p16/Ki-67 expression in anal samples

Lêda Maria Santos Rufino MD¹, Tânia Wanderley Paes Barbosa MD¹, Fabiana Pirani Carneiro MD, PhD¹, Livia Bravo Maia MD, PhD², Cristovam Scapulatempo Neto MD, PhD², Paulo Gonçalves de Oliveira MD, PhD³.

Pathological Anatomy Center of University Hospital of Brasilia¹, Department of Pathological Anatomy and Molecular Biology of Exame Laboratory², Department of Coloproctology of University Hospital of Brasilia³.

Lêda Maria Santos Rufino, MD.

Unidade de Anatomia Patológica

Hospital Universitário de Brasília, UNB

Via L2 Norte, SGAN 604/605

Brasília DF, Brasil

CEP: 70840-050

Tel: 55 61-2028 5499

e-mail: ledarufino@hotmail.com

All authors declare any conflicts of interest

ABSTRACT

BACKGROUND: Considering the role of co-expression of p16 and ki-67 (CINtec PLUS) in detection of cervical high-grade intraepithelial neoplasia and carcinoma, we hypothesized that CINtec PLUS has the same performance in detection of anal high-grade intraepithelial neoplasia and carcinoma. The aim of this study was to evaluate the performance of CINtec PLUS and high-risk DNA HPV (human papilloma virus) detection by PCR on anal cytological samples. **METHODS:** Liquid based cytology and biopsy of anal samples of 33 HIV-positive men and women, without visible lesions detected on external examination, were evaluated by immunocytochemistry using a morphology-independent interpretation p16/Ki-67 dual-stain and by PapilloCheck testing for HPV detection. **RESULTS:** HR-HPV+ samples were observed in 77.77% of the samples with cytological abnormalities and in 42.85% of the negative samples. Concomitant positive expression of p16/Ki-67 was observed in 33.33% of the samples with cytological abnormalities. P16/Ki-67 + cytology samples showed clusters of double-stained cells and most positive cells were atypical cells. In biopsy with high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) double-stained cells were observed in full thickness of the epithelium. Expression of p16/Ki-67 was observed on the only sample with biopsy diagnosis of HSIL but only one of the 7 samples diagnosed with low grade squamous intraepithelial lesion was p16/Ki-67+. **CONCLUSION:** The results suggest that p16/Ki67 stain is a method easy to perform and interpret and may be useful to improve specificity of cytology for detecting anal HSIL.

Keywords: HPV, anal cytology, immunocytochemistry, p16/Ki67

INTRODUCTION

Anal cancer is an uncommon disease in the general population, but the incidence gradually is increasing particularly in those individuals who are HIV-positive¹. The proposed screening methods for detecting anal intraepithelial neoplasia (AIN) include digital rectal examination, anal visual inspection and cytological test, and abnormal cytological results should be investigated using high-resolution anoscopy (HRA), with biopsy of the suspicious lesions²⁻⁴. The sensitivity of anal cytology for high-grade AIN, using atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) as the threshold for triage to HRA, is considered high but the specificity is low⁵. HPV (human papillomavirus) tests can be very useful improving sensitivity of cytology to detect anal intraepithelial neoplasia (AIN) and for the post-treatment follow-up, because of its excellent negative predictive value (NPV)⁶. However, the specificity and the positive predictive value (PPV) are low, because of the high prevalence of high-risk HPV in HIV-positive patient⁵.

p16 (a cyclin-dependent kinase inhibitor) is known to be overexpressed in cervical high-grade precursor lesions (CIN2+) and invasive cervical squamous cancer. However, the clinical utility of this marker has been limited since p16 expression can occur in benign squamous or glandular lesions and in normal epithelium as well^{7,8}. Recently, several reports have shown that the co-expression of p16 and Ki-67 protein (a marker associated with cell proliferation) is rarely observed in normal tissue or in benign lesions of the squamous or glandular mucosa being a potential diagnostic approach to enhance the accuracy of cervical diagnosis^{9,10}. CINtec PLUS (Roche, USA), an immunostaining kit that simultaneously detects both of these biomarkers, might have a relevant clinical role, since the positivity for this biomarker is strongly related to the presence of a CIN2+ lesion in cytology and histology¹¹⁻¹³. Considering the potential role of such marker in anal screening cancer, the aim of this study was evaluating the expression of the CINtec PLUS dual immunostaining and HPV detection on anal cytological samples.

MATERIAL AND METHODS

This study included 33 HIV-positive men and women older than 18 years, without visible lesions detected on external examination, treated at Infectious Disease Service and at Department of Coloproctology, both of Brasilia University Hospital. The patients were invited to participate of this study, and those that agreed were asked to sign an informed consent. This study was approved by the Ethics in Research Committee of Brasilia University (CEP-FM 062-2008).

Cytology, anoscopy and biopsy

Samples were collected first for cytology and then for HPV genotyping. The technique used for collection consisted of introducing a regular endocervical brush 4 cm into the anal canal and rotating it 180 degrees¹⁴. The samples were transferred to PreservCyt and the slides were prepared using ThinPrep 2000 processor (Hologic, Bedford, Massachusetts, USA). The slides were kept in 100% ethanol and then stained using the Papanicolaou method. Cytological abnormalities were classified according to the 2001 Bethesda criteria using categories: negative for malignancy; atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US); low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL); atypical squamous cells - cannot exclude a high-grade lesion (ASC-H); and high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and invasive carcinoma¹⁵. After specimen collection, all patients underwent High-Resolution Anoscopy (HRA) and anal biopsy was performed when lesions were observed.

HPV typing using microarrays

A PAPILLOCHECK® kit (GREINER BIO-ONE) was used for molecular analysis using microarrays¹⁶. Microarrays for DNA genotyping may also be called DNA chips, biological chips or biochips. The collection technique was the same used for cytology and the sample was transferred to PapilloCheck collection medium provided by the manufacturer. PAPILLOCHECK® kit detects 24 HPV subtypes, 6 of which are low risk (6, 11, 40, 42, 43, 44, 55) and 18, high risk (16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 68, 73, 82, 53, 66, 70). Positive results were those with a viral load (signal-to-noise ratio [SNR]) greater than 20. Results are expressed qualitative and semi-quantitatively (SNR) for the 24 low and high-risk HPV types simultaneously. SNR values lower than 100 indicate a small number of viral copies per cell, which might be a sign of initial infection or spontaneous remission. High SNR values suggest a greater probability of recurrence or persistent infection.

Immunocytochemistry

Stained slides were destained using xylol, alcohol, acid-alcohol and water, and then immunostained utilizing CINtec PLUS kit (MTM laboratories, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer instructions. CINtec PLUS kit contains a ready-to use primary antibody cocktail comprising a mouse monoclonal antibody (clone E6H4) directed against human p16INK4a (p16) protein and a rabbit monoclonal antibody (clone 274-11 AC3) directed against human Ki-67 protein. Horseradish peroxidase-mediated conversion of 3,30-diaminobenzidine (DAB) chromogen, and alkaline phosphatase-mediated conversion of Fast Red chromogen results in brown and red staining at the p16 and Ki-67 antigen sites, respectively. All immunostained slides were analyzed and scored independently by two cytopathologists blinded to the cytological and histological diagnoses and HPV test results. Samples were scored as positive when p16 and Ki-67 were co-expressed in the same cell (cytoplasmic brown staining for p16 and nuclear red staining for Ki-67). According to the manufacturer's instruction, one double-stained cell was enough to score the sample as positive.

Immunohistochemistry

HRA and biopsy were performed in the only case of anal HSIL, using anoscope and surgical tweezers. CINtec PLUS kit immunostaining was applied to the sample, according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

From the 33 cases studied, 18 (54,54%) had cytology alterations (ASC-US, n=5; LSIL, n=10; ASC-H, n=2; HSIL, n=1) and 15 cases (45.45%) were negative, as shown in Table 1.

From the 18 cases with altered cytology, co-expression of p16/Ki-67 was observed in 6 cases (33.33%). P16/Ki-67 + cytology samples showed clusters of double-stained cells and most positive cells were atypical cells (immature cells with karyomegaly) (Figure 1). In biopsy with high-grade squamous intraepithelial lesion, double-stained cells were observed in full thickness of the epithelium (Figure 2).

From the 33 cases, high-risk HPV (HR-HPV) was detected in 20 cases (60.6%), in 14 (77,77%) cases with altered cytology and in 6 cases (42,85%) without alterations in cytology.

Cytology and biopsy results according to p16/Ki67 expression and HR-HPV detection are shown in table 1.

Throughout the cohort, p16/Ki-67- HR HPV+ status was observed in 16 cases (48,48%). Most (62.5%, 10/16) p16/Ki-67- HR HPV+ samples had cytological abnormalities (ASC-US, n=1; ASC-H, n=1, LSIL, n=8). The diagnosis of anal intraepithelial neoplasia grade 1 (AIN1) was confirmed in the biopsy of 3 patients with cytology diagnosis of LSIL and in one patient with ASC-H; no lesions were observed in HRA of the other patients and the biopsy was not performed. In one patient with p16/Ki-67- HR HPV+, cytology was negative but at HRA one lesion was detected and biopsied, with

the diagnosis of AIN1. In the remaining 5 patients (31,25%) p16/Ki-67- HR HPV+ samples, cytology and HRA were negative.

Eleven cases (33,33%) had p16/Ki-67- HR HPV- status. Most (81.81%, 9/11) p16/Ki-67- HR HPV- samples were cytology negative, but in 2, lesion was observed in HRA with the follow diagnosis of the biopsies: AIN1 and normal. Only two p16/Ki-67 - HR HPV- samples had cytological abnormalities (ASC-US, n=1; LSIL, n=1). No lesions were observed in HRA of these patients and biopsy was not performed.

P16/Ki-67 + HR HPV+ samples corresponded to 12.12% (4/33) of all samples. All p16/Ki-67+ HR HPV+ samples had cytological abnormalities: ASC-US, n=1; LSIL, n=1; ASC-H, n=1; HSIL, n=1. The patients with LSIL and HSIL had the diagnosis confirmed by biopsy, no lesions were observed in HRA of the patients with ASC-US and ASC-H and biopsy was not performed.

P16/Ki-67 + HR HPV- samples corresponded to 6.06% (2/33) of the samples. The two p16/Ki-67+ HR HPV- samples were cytological diagnosed as ASC-US. No lesions were observed in HRA of these patients and biopsy was not performed.

DISCUSSION

A poor correlation between the cytological and histological grade of AIN has been observed since cytology underestimates the grade of dysplasia compared to the corresponding biopsy¹⁷. Because the interpretation of the p16/Ki-67 expression is independent of cytomorphology and is significantly associated with the increasing grade of the cervical lesions, this stain has the potential to provide a more objective method for the triage of AIN. In the present study, CINtec PLUS dual stain was performed on anal cytology and biopsy samples. Expression of p16/Ki-67 was observed in 18.18% (6/33) of the cytological samples and all these p16/Ki-67+ samples had cytological abnormalities (ASC-US, n=3; LSIL, n=1; ASC-H, n=1; HSIL, n=1). The cytological diagnosis of the

samples with LSIL and HSIL was confirmed by biopsy, but no lesions were observed in HRA of the patients with ASC-US and ASC-H and biopsy was not performed.

Co-expression of p16/Ki-67 was observed in only sample with biopsy diagnosis of HSIL, but only one of the 7 samples diagnosed with LSIL was p16/Ki-67+. In negative cytology samples, p16/Ki-67 expression was not observed. According to previous study, none of the NILM cases was positive for the dual staining, while the proportion of p16/Ki-67 positive cases increased significantly with the severity of the histological diagnosis being 39.4% among the cases with a CIN1 diagnosis, 70.8% in CIN2, and 86.5% in CIN3 and SCC cases¹¹. Increasing percentage of samples with p16/ Ki-67 staining is also associated with increasing severity of AIN^{18,19}.

On cervical samples, p16/Ki-67 is significantly more specific when compared to either Ki-67 or p16 alone and to HPV test for detection of an underlying or subsequent HSIL on smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion²⁰⁻²². In the present study, no patient with p16/Ki-67+ cells and with diagnosis of ASC-US and ASC-H presented lesion in HRA but, considering the possibility of development of a subsequent HSIL, these patients should be followed-up, mainly those with high-risk HPV.

Most of the anal cytology samples (48.48%) of the present study were p16/Ki-67 - HR HPV+. This high number of samples with high-risk HPV can be explained by the high prevalence of high-risk HPV in anal samples of HIV-positive patients⁵. No expression of p16/Ki-67 was observed in negative cytology samples but high-risk HPV types were detected in 42.85% of them suggesting a higher specificity of p16/Ki-67 expression when compared to high-risk HPV test. However, in samples with cytological abnormalities, p16/Ki-67 expression was very low (33.33%) when compared to high-risk HPV detection (77.77%) suggesting a lower sensitivity.

The criteria for the interpretation of CINtec PLUS positivity include double expression in even a single cell independent of cytomorphology. In present study most p16/Ki-67 positive cytology

samples showed clusters of double-stained cells and most positive cells were atypical cells thus decreasing the potential for a false positive interpretation.

In conclusion, the results suggest that p16/Ki67 stain is a method easy to perform and interpret and may be useful to improve specificity of cytology for detecting anal high-grade squamous intraepithelial lesion. However, other studies with major number of cases are required to confirm it.

REFERENCES

- 1 Grulich AE, Poynten IM, Machalek DA, Jin F, Templeton DJ, Hillman RJ. The epidemiology of anal cancer. *Sex Health*. 2012 Dec;9(6):504-8.
- 2 Darragh TM, Winkler B (2011) Anal cancer and cervical cancer screening: key differences. *Cancer Cytopathol* 119(1):5-19.
- 3 Sigel K, Dubrow R, Silverberg M, Crothers K, Braithwaite S, Justice A (2011). Cancer screening in patients infected with HIV. *Curr HIV/AIDS Rep* 8(3):142-52.
- 4 Tyerman Z, Aboulaflia DM (2012) Review of screening guidelines for non-AIDS-defining malignancies: evolving issues in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Rev* 14(1):3-16.
- 5 Salit IE, Lytwyn A, Raboud J, Sano M, Chong S, Diong C, Chapman W, Mahony JB, Timmouth J (2010) The role of cytology (Pap tests) and human papillomavirus testing in anal cancer screening. *AIDS* 1;24(9):1307-13.
- 6 Etienney I, Vuong S, Si-Mohamed A, Fléjou JF, Atienza P, Bauer P; the Cytological Diaconesses Group. Value of cytologic Papanicolaou smears and polymerase chain reaction screening for human papillomavirus DNA in detecting anal intraepithelial neoplasia: Comparison with histology of a surgical sample. *Cancer* 2012; 6.

- 7 Benevolo M, Vocaturo A, Mottolese M, Mariani L, Vocaturo G, Marandino F, et al. Clinical role of p16INK4a expression in liquid-based cervical cytology: correlation with HPV testing and histologic diagnosis. *Am J Clin Pathol* 2008;129:606–12.
- 8 Meyer JL, Hanlon DW, Andersen BT, Rasmussen OF, Bisgaard K. Evaluation of p16INK4a expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK4a assay: correlation with biopsy follow-up results. *Cancer* 2007;111:83–92.
- 9 Samarawardana P, Singh M, Shroyer KR. Dual stain immunohistochemical localization of p16INK4A and ki-67: a synergistic approach to identify clinically significant cervical mucosal lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011 Dec;19(6):514-8.
- 10 Agoff SN, Lin P, Morihara J, et al. p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol*. 2003;16:665–673.
- 11 Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, Carosi M, Vocaturo G, Benevolo M. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol*. 2012 Aug;126(2):198-202.
- 12 Nam EJ, Kim JW, Hong JW, et al. Expression of the p16 and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol* 2008;19:162–168.
- 13 Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, Allen RA, Zhang R, Dunn ST, Walker JL, Schiffman M. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res*. 2012 Aug 1;18(15):4154-62.

14 Nadal SR, Horta SHC, Calore EE, Nadal LRM, Manzione CR (2009) Quanto a escova deve ser introduzida no canal anal para avaliação citológica mais eficaz? *Rev. Assoc. Med Bras* 55 (6):7498-51.

15 Solomon D, Davey D, Kurman R, et al (2002) Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287(16):2114-9.

16 PAPILOCHECK®: Test Kit for the genotyping of 24 types of genital HPV: Manual. Version BQ-013-04, 2008.

17 Betancourt EM, Wahbah MM, Been LC, Chiao EY, Citron DR, Laucirica R. Anal cytology as a predictor of anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive men and women. *Diagn Cytopathol.* 2013 Jan 3.

18 Wentzensen N, Follansbee S, Borgonovo S, Tokugawa D, Schwartz L, Lorey TS, Sahasrabudhe VV, Lamere B, Gage JC, Fetterman B, Darragh TM, Castle PE. Human papillomavirus genotyping, human papillomavirus mRNA expression, and p16/Ki-67 cytology to detect anal cancer precursors in HIV-infected MSM. *AIDS.* 2012 Nov 13;26(17):2185-92.

19 Darragh TM, Tokugawa D, Castle PE, Follansbee S, Borgonovo S, LaMere BJ, Schwartz L, Gage JC, Fetterman B, Lorey T, Wentzensen N. Interrater agreement of anal cytology. *Cancer Cytopathol.* 2013 Feb;121(2):72-8.

20 Loghavi S, Walts AE, Bose S. CINtec® plus dual immunostain: A triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn Cytopathol.* 2012 Jul 26.

21 Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R; European CINtec Cytology Study Group. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the

European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol.* 2011 Jun 25;119(3):158-66.

22 Ikenberg, H et al. Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Oct 16; 105(20): 1550-1557.