



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

Otimização do rastreio do cancro do colo do útero através da dupla coloração imunocitoquímica p16/ki67

Natália Sofia Costa Guerreiro

Orientado por:

Dr. Joaquim Silva Neves

Co-Orientado por:

Dra. Maria Amália Dias Pacheco de Oliveira

MARÇO 2022

Resumo

O vírus do papiloma humano (HPV) é o agente etiológico do cancro do colo do útero (CCU). Trata-se do oitavo cancro mais comum no mundo e a quarta causa de morte por cancro na mulher. Com o objetivo de reduzir a incidência de CCU, desenvolveram-se programas de rastreio organizado, destinados a mulheres com idade compreendida entre os 25 e 60 anos.

A baixa especificidade dos testes HPV, associada à subjetividade crescente da interpretação da citologia, gerou a necessidade de novos testes de triagem, nomeadamente a dupla coloração imunocitoquímica dos biomarcadores p16/ki67. Este teste tem elevada sensibilidade e especificidade para a deteção de lesões de alto grau, com alto valor preditivo positivo.

Assim, o objetivo deste trabalho final de mestrado, é estudar de forma preliminar a relevância da dupla coloração imunocitoquímica dos biomarcadores p16/ki67, como método de triagem, promovendo uma otimização do rastreio do CCU.

Foi realizado um estudo observacional descritivo e retrospectivo, pela análise de dados da consulta de ginecologia do CHLN – unidade do hospital de Santa Maria.

Pressupõe-se que os resultados da inclusão da dupla marcação, num contexto de triagem de testes HPV positivos e citologias de baixo grau, contribua para uma otimização do paradigma atual, relativamente aos métodos de rastreio do CCU em Portugal, de forma a diminuir a referenciação para as unidades de colposcopia e todas as implicações associadas.

Palavras-Chave: Cancro do colo do útero; HPV; Rastreio; Dupla marcação; Co-fatores.

O trabalho final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados.

Abstract

Human papilloma virus (HPV) is the cervical cancer major (CC) etiologic agent. CC is the eight most common worldwide cancer and in the same extension, the fourth death cause from cancer in women. In order to reduce CC incidence, organized screening programs were developed for women aged between 25 and 60 years old.

The HPV tests low specificity, associated with increasing cytology interpretation subjectivity, are main reasons for new screening strategy, including test as immunocytochemical double staining with p16/ki67 biomarkers (DS). This test has a high sensitivity and specificity for detecting high-grade lesions, with high positive predictive value.

Thus, this master's final work goal, is to evaluate immunocytochemical double staining with p16/ki67 biomarkers relevance as a screening method, promoting CC screening optimization.

This masterwork is a preliminary descriptive and retrospective observational study, analyzing data from opportunistic cervical screening in women on outpatient gynecologic setting in Centro Hospitalar Lisboa Norte, hospital de Santa Maria unit.

It is assumed that DS inclusion in a triage context for positive HPV tests and low-grade cytology, will contribute to current paradigm optimization in relation to CC screening methods in Portugal, promoting a reduction for unnecessary referral to colposcopy units and all associated implications.

Keywords: Cervical cancer; HPV; Screening; Dual stain; Risk Factors.

The author master final work responsibility concerning its contents, is his one and not from Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Índice

<i>Resumo</i>	2
<i>Abstract</i>	3
<i>Lista de Abreviaturas</i>	6
<i>Introdução</i>	7
<i>Métodos</i>	10
População em estudo.....	10
Citologia e teste HPV.....	10
Dupla Coloração Imunocitoquímica p16/Ki67 (DS).....	11
Vigilância.....	11
Demografia.....	12
<i>Resultados</i>	13
População em estudo.....	13
Demografia dos casos negativos (p16 e Ki67).....	14
Demografia dos casos positivos (p16 e Ki67).....	14
Citologia basal dos casos negativos (p16 e Ki67).....	16
Citologia a 12 meses dos casos negativos (p16 e Ki67).....	17
Citologia basal dos casos positivos (p16 e Ki67).....	18
Citologia a 12 meses dos casos positivos (p16 e Ki67).....	20
Resultados da genotipagem HPV nas mulheres DS negativas.....	21
Resultados da genotipagem HPV em mulheres DS positivas.....	22
Citologia basal e a infeção por HPV outros em mulheres DS negativas.....	23
Citologia basal e a infeção por HPV outros em mulheres DS positivas.....	24
Resultados da análise DS.....	25
Lesão de alto grau na biópsia e co-fatores associados.....	27

<i>Discussão</i>	31
<i>Conclusão</i>	38
<i>Bibliografia</i>	39

Lista de Abreviaturas

AGC	Células Glandulares Atípicas
ASC-H	Células Pavimentosas Atípicas, sem excluir Lesão Intraepitelial de Alto Grau
ASC-US	Células Pavimentosas Atípicas de Significado Indeterminado
CCU	Cancro do Colo do Útero
CHLN	Centro Hospitalar Lisboa Norte
CIN 1	Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau 1
CIN 2	Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau 2
CIN 3	Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau 3
DS	Teste de Dupla Coloração Imunocitoquímica p16/ki67
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HSIL	Lesão Intraepitelial Pavimentosa de Alto Grau
LSIL	Lesão Intraepitelial Pavimentosa de Baixo Grau
NILM	Negativa para Lesão Intraepitelial ou Neoplasia Maligna
NOS	Células Glandulares Atípicas sem especificação;
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

Introdução

O cancro do colo do útero é a quarta causa morte por cancro na mulher e o oitavo cancro mais comum no mundo (*GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC, n.d.*). O agente etiológico mais relevante é o HPV, sendo os mais virulentos, os tipos 16 e 18.

A prevenção é fundamental, e a incidência e a mortalidade têm vindo a diminuir devido à implementação de programas de rastreio primário e secundário, nomeadamente nos países desenvolvidos (Cohen et al., 2019; Kashyap et al., 2019).

A infeção persistente pelo HPV é condição necessária ao desenvolvimento de lesões que podem evoluir para CCU. Por conseguinte, foram elaboradas estratégias de rastreio para a deteção de lesões pré-neoplásicas (Wentzensen et al., 2015). Atualmente os métodos de rastreio incluem a citologia cervical e a genotipagem dos HPV de alto risco. Em Portugal, o rastreio é essencialmente oportunista, com estudos-piloto na tentativa de ser mais universal, e pode aplicar-se segundo três opções (Moutinho, 2014):

- Opção 1: citologia de 3 em 3 anos a partir dos 21 anos e/ou pelo menos 3 anos após início da atividade sexual; estratégia adequada;
- Opção 2: citologia de 3 em 3 anos, a partir dos 21 anos e/ou pelo menos 3 anos após início da atividade sexual. A partir dos 30 anos teste de HPV de alto risco com citologia reflexa (nos casos de HPV positivos) de 5 em 5 anos; estratégia recomendada;
- Opção 3: citologia de 3 em 3 anos a partir dos 21 anos e/ou pelo menos 3 anos após início da atividade sexual. A partir dos 30 anos citologia com teste de HPV associado (co-teste), de 5 em 5 anos; estratégia adequada.

A citologia como método de rastreio tem a sensibilidade limitada para deteção precoce de lesões precursoras (Wentzensen et al., 2012). O teste HPV, quando comparado com a citologia, tem elevada sensibilidade e elevado VPN (Neves, 2019). Deste modo, confere a garantia de baixo risco de CCU, permitindo prolongar o intervalo de tempo do rastreio com segurança (Wentzensen et al., 2015).

Contudo é menos específico que a citologia (a maioria da infeção ao HPV é transitória), o que resulta no aumento de resultados positivos, principalmente na população jovem, e consequentemente no maior número de referências à colposcopia. Neste sentido, recomendam-se marcadores mais específicos para uma abordagem e rastreio mais eficientes (Collaboration et al., 2007; Cuschieri et al., 2018; Ikenberg et al., 2013).

Apesar de ser causa necessária, a infeção pelo HPV não é suficiente para o desenvolvimento de CCU, existindo outros cofatores relevantes para a progressão da infeção ao estágio de neoplasia (Joseph A Westrich, Cody J Warren, 2017).

A maioria das infeções pelo HPV, são passíveis de resolução espontânea, neste sentido o sucesso do rastreio depende da triagem das mulheres positivas para o HPV (Joseph A Westrich, Cody J Warren, 2017; Wentzensen et al., 2015).

Atualmente, a combinação do teste HPV com a citologia (co-teste), decide quais as mulheres que devem ser referenciadas à colposcopia (Moutinho, 2014). No entanto, muitas das colposcopias são dispensáveis, não sendo viável nem eficiente, orientar todas as mulheres HPV positivas, sendo que a maioria não apresenta lesões precursoras, e eventualmente colher material para biópsias e instituir terapêuticas injustificadas (Cuschieri et al., 2018; Moutinho, 2014; Wentzensen et al., 2015).

Na tentativa de melhorar o rastreio em excesso, foi necessário desenvolver novos testes de triagem que permitem estratificar o risco e indicar as mulheres que verdadeiramente necessitam da avaliação em colposcopia, nomeadamente a dupla coloração imunocitoquímica dos biomarcadores p16/Ki67 (DS) (Wentzensen et al., 2014, 2015).

A DS apresenta sensibilidade e especificidade superiores ao co-teste, para a deteção de lesões precursoras, e os VPP e VPN são igualmente elevados. A DS constitui um ótimo auxílio para a estratificação de risco nas mulheres com positividade para o HPV e estima-se que reduz para metade o número de colposcopias necessárias (Benevolo et al., 2017; Bergeron et al., 2015; Cuschieri et al., 2018; Wentzensen et al., 2012, 2015).

A menor positividade, permite previsão do risco a longo prazo, superior ao co-teste, diminuindo desta forma, os custos associados ao rastreio e seguimento do CCU, e a morbilidade inerente à colposcopia que pode induzir a realização de biópsias e terapêuticas dispensáveis (Clarke et al., 2019).

Neste estudo preliminar, pretende fazer-se uma análise do rastreio oportunístico do CCU e sobretudo da relevância da utilização da DS aplicada à realidade de uma amostra populacional portuguesa, com o objetivo de promover uma alteração de paradigma, evitando gastos desnecessários, sobrecarga das unidades de colposcopia e minimizando a ansiedade e iatrogenia associadas.

População em estudo e os métodos

Trata-se dum estudo preliminar, observacional, retrospectivo com a consulta de registos clínicos e resultados dos testes de HPV e da citologia simples e dupla marcação com dois antigénios p16 e Ki67.

As mulheres em avaliação na consulta de ginecologia foram informadas e esclarecidas sobre os procedimentos com registo clínico de informada e esclarecida.

População em estudo

Analisaram-se os dados de 217 mulheres seguidas em consulta de ginecologia no CHLN - unidade do hospital de Santa Maria, entre 2014 e 2021.

As mulheres, com idades compreendidas entre os 25 e 65 anos, realizaram o rastreio oportunista do cancro do colo do útero. Foram incluídas no estudo, as que obtiveram os seguintes resultados na citologia basal: NILM, ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, AGC, NOS e alterações benignas. Todas apresentaram positividade para o HPV, independentemente do genótipo.

Adicionalmente, fez-se uma repescagem de mulheres entre os 66 e os 74 anos, que nunca realizaram a avaliação do colo do útero com genotipagem HPV.

Citologia e teste HPV

A classificação da citologia é baseada sistema de Bethesda de 2001.

De modo a simplificar e facilitar o tratamento dos dados, dividiu-se a classificação em: citologia negativa inclui os resultados negativos e outras alterações benignas; e a citologia positiva que corresponde a: ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, AGC e NOS.

No subgrupo de outras alterações benignas apontam-se: alterações reativas associadas a inflamação, atrofia ou metaplasia.

O teste de HPV foi realizado a toda a população em estudo. Diferenciaram-se as mulheres que apresentavam HPV 16, HPV 18 e todos os outros genótipos de HPV (HPV outros).

Dupla Coloração Imunocitoquímica p16/Ki67 (DS)

Todas as mulheres neste estudo realizaram o teste DS e os resultados foram organizados em positivo e negativo.

Vigilância

No subgrupo do resultado negativo para a DS, optou-se pela atitude expectante, (mulheres informadas verbalmente e anotação realizada no registo clínico) e repetiu-se o co-teste em 12 meses.

Em alternativa, todas as mulheres com resultado positivo no mesmo teste, foram referenciadas para a consulta de colposcopia com reanálise e eventual realização de biópsia do colo do útero.

Os resultados da biópsia estão categorizados em: baixo grau, alto grau, alterações benignas e sem alterações.

Não obstante, as mulheres que positivaram na DS, repetiram o co-teste em 12 meses.

Aspetos clínico-demográficos

Simultaneamente, analisaram-se co-fatores intervenientes na história natural do cancro do colo do útero, nomeadamente:

- Idade;
- Vacinação contra o HPV;
- Hábitos tabágicos; fumadora corrente (mais de 100 cigarros na vida);
- Idade de início da vida sexual;
- Número de parceiros sexuais;
- Tipo de contraceção;
- Menarca;
- Menopausa;
- Paridade.

No caso particular do tipo de contraceção, organizaram-se 3 categorias:

- Contraceção hormonal (CH): contraceção hormonal combinada (oral, transdérmica e vaginal) e contraceção exclusiva com progestativos (oral, injeção intramuscular de medroxiprogesterona, implante subcutâneo de etonogestrel e dispositivo libertador intrauterino de levonogestrel);
- Contraceção não hormonal (CNH): preservativo e DIU de cobre;
- Sem registo de contraceção.

Resultados

População em estudo

Neste estudo, foram analisados retrospectivamente os dados clínicos de 217 mulheres, em vigilância na consulta de ginecologia no hospital de Santa Maria, com idades compreendidas entre os 25 e os 74 anos. A média de idade das mulheres é de 42 anos (desvio padrão, 13 anos) e a mediana é de 40 anos (mínimo: 25 anos e máximo: 74 anos).

Demografia dos casos negativos (p16 e Ki67)

No quadro 1, estão representados os aspetos clínico-demográficos:

Idade	44±13 anos		
Menarca	12±2 anos		
Menopausa	15 casos em pós-menopausa 48 ± 5 anos		
Vacinação contra HPV	Sim 3/95	Não 56/95	Sem registo 36/95
Tabagismo	Sim 18/95	Não 45/95	Sem registo 32/95
Início da vida sexual	57/95 casos 18 ± 2 anos		
Número de parceiros sexuais	56/95 casos 3 ± 2 parceiros		
Contraceção	Hormonal 55/95	Não hormonal 16/95	Sem registo 17/95
Paridade	Múltiparas 51/95	Nulíparas 15/95	Sem registo 29/95

*7 casos sem qualquer contraceção

Quadro 1 – total 95 casos

Demografia dos casos positivos (p16 e Ki67)

No quadro 2, estão representados os aspetos clínico-demográficos:

Idade	41 ± 12 anos		
Menarca	13 ± 2 anos		
Menopausa	21 – 17% dos casos em pós-menopausa 47 ± 7 anos		
Vacinação contra HPV	Sim 8 – 7%	Não 69 – 57%	Sem registo 45 – 36%
Tabagismo	Sim 28 – 23%	Não 58 – 47%	Sem registo 36 – 30%
Início da vida sexual	72 – 59% casos 17 ± 3 anos		
Número de parceiros sexuais	72 – 59% 5 ± 6 parceiros		
Contraceção	Hormonal 74 – 61%	Não hormonal 15 – 12%	Sem registo 26 – 21%
Paridade	Múltiparas 73 - 60%	Nulíparas 24 - 19%	Sem registo 25 – 21%

*7 casos sem qualquer contraceção (6%)

Quadro 2 – total 122 casos

Os resultados revelam a tendência para que os casos positivos sejam mulheres mais novas; nesta amostra a média da idade é de menos 3 anos.

O número de parceiros sexuais tende a ser maior nas mulheres com DS positiva, com o desvio padrão a indicar que neste item, a distribuição não é homogénea.

Em ambos subgrupos, a maioria das mulheres são multíparas.

Citologia basal dos casos negativos (p16 e Ki67)

O quadro 3 representa os resultados da citologia basal neste subgrupo: não existem casos de HSIL na citologia basal das DS negativas.

Citologia basal	Frequência
Negativa	65/95
ASCUS	7/95
LSIL	12/95
NOS	1/95
Alterações benignas	10/95

Quadro 3 – total 95 casos

Citologia a 12 meses dos casos negativos (p16 e Ki67)

O quadro 4 representa os resultados da citologia a 12 meses neste subgrupo: mantém-se a observação de que não existem casos de HSIL.

Citologia 12 meses	Frequência
Negativa	59/95
ASCUS	9/95
LSIL	8/95
ASC – H	3/95
Alterações benignas	16/95

Quadro 4 – total 95 casos

Citologia basal dos casos positivos (p16 e Ki67)

O quadro 5 representa os resultados da citologia basal neste subgrupo:

Citologia basal	Frequência
Negativa	17 – 17%
Alterações benignas	22 – 18%
ASCUS	12 – 10%
LSIL	63 – 51%
ASC - H	4 – 3%
NOS	1 – 1%
AGC	1 – 1%
HSIL	2 – 2%

Quadro 5 – total 122 casos

O quadro 6 representa os resultados da **biópsia** neste subgrupo: 111 casos avaliados em colposcopia, não realizaram biópsia; 28 casos (25%) com a presença de lesão de alto grau e 40 casos (36%) com lesão de baixo grau.

Biópsia	Frequência
Negativa	23 – 21%
Alterações benignas	18 - 16%
LSIL	40 - 36%
HSIL	28 - 25%
Amostra insuficiente	2 - 2%

Quadro 6 – total 111 casos

Citologia a 12 meses dos casos positivos (p16 e Ki67)

O quadro 7 mostra os resultados da citologia a 12 meses neste subgrupo: aponta-se para a ocorrência de casos com citologias ASC-H, AGC e HSIL (10 casos) comparativamente com citologia ASC-H (3 casos nas DS negativas e a 12 meses).

Citologia 12 meses	Frequência
Negativa	44 – 36%
Alterações benignas	31 – 25%
ASCUS	13 – 10%
LSIL	26 – 21%
ASC - H	5 – 4%
AGC	1 – 1%
HSIL	4 – 3%

Quadro 7 – total 122 casos

Resultados da genotipagem HPV nas mulheres DS negativas

O quadro 8 representa a distribuição da positividade do teste HPV basal neste subgrupo:

Tipo do HPV	Frequência
HPV 16	4/95
HPV 18	4/95
Outros HPV	83/95
HPV 16 e 18	0/95
HPV 16 e outros	2/95
HPV 18 e outros	1/95
Todos HPV	1/95

Quadro 8 – total 95 casos

Destaca-se a infeção por outros tipos de HPV que não 16 e 18, na maioria das mulheres (83 casos), comparativamente com os restantes tipos de HPV, sendo expectável, pois as infeções ao HPV que não 16 ou 18 são mais prevalentes.

Resultados da genotipagem HPV em mulheres DS positivas

O quadro 9 representa a distribuição da positividade do teste HPV basal neste subgrupo:

Tipo do HPV	Frequência
HPV 16	17 - 14%
HPV 18	3 - 2%
Outros HPV	83 - 68%
HPV 16 e 18	1 - 1%
HPV 16 e outros	10 - 8%
HPV 18 e outros	7 - 6%
Todos HPV	1 - 1%

Quadro 9 – total 122 casos

Destaca-se novamente a superioridade da positividade do teste para outros tipos de HPV que não 16 e 18, presente em 66% das mulheres (81 casos).

Neste subgrupo (DS positivas), verifica-se uma frequência superior da infeção por HPV 16, com 17 casos (14%) comparativamente com 4 casos no subgrupo DS negativas.

Da mesma forma, a presença concomitante de infeção por HPV 16 ou 18 com outros tipos de HPV (10 e 7 casos, respetivamente) é superior quando comparado com subgrupo das DS negativas (2 e 1 casos, respetivamente).

Citologia basal e a infeção por HPV outros em mulheres DS negativas

O quadro 10 mostra a relação entre a positividade dos HPV outros e os resultados da citologia neste subgrupo:

Citologia	Frequência
NILM	59/83
LSIL e ASCUS	16/ 83
Alterações Benignas	8/ 83

Quadro 10 – total 83 casos

Verifica-se a superioridade de citologias negativas (59/83) quando comparado com os restantes resultados.

Citologia basal e a infeção por HPV outros em mulheres DS positivas

O quadro 11 representa a relação entre a positividade dos HPV outros e os resultados da citologia neste subgrupo:

Citologia	Frequência
NILM	9/83
LSIL e ASCUS	53/83
ASH-H	1/83
HSIL	1/83
Alterações Benignas	18/83

Quadro 11 – total 83 casos

Comparativamente ao subgrupo DS negativas, nestes casos a maioria corresponde às citologias com resultados LSIL e ASCUS (53/83).

Resultados da análise DS

Nesta análise, foram avaliadas as 217 mulheres: 95 apresentaram um resultado negativo e 122 obtiveram um resultado positivo.

DS negativas; citologia:

A citologia basal negativa (negativa e/ou alterações benignas) em 75/95 mulheres e após 12 meses, apresentou novamente um resultado negativo em 63/75 mulheres. Apenas em 12/75 surgiu um resultado positivo.

A citologia basal foi positiva em 20/95 mulheres e na avaliação a 12 meses, o resultado da citologia continuou positivo em 8/20 e negativou em 12/20 mulheres.

O quadro 12 representa a distribuição da classificação das citologias em DS negativas; basal e 12 meses:

Citologia	Basal	12 meses	
Negativa	75/95	63/75 negativas	12/75 positivas
Positiva	20/95	12/20 negativas	8/20 positivas

Quadro 12 – total 95 casos

DS negativas; positividade ao HPV:

O quadro 13 representa a distribuição da positividade do teste HPV em DS negativas; basal e 12 meses:

Teste HPV	Basal	12 meses
Negativo	0	63
Positivo	95	32

Quadro 13 – total 95 casos

Das 95 mulheres DS negativas, e que repetiram a citologia a 12 meses, apenas 32/95 mantiveram a infeção pelo HPV (16, 18 ou outros) e a infeção por HPV foi negativa em 63/95 mulheres (na maioria dos casos).

DS positivas; citologia:

O quadro 14 representa a distribuição das citologias simples negativas em DS positivas; basal e 12 meses:

Citologia	Basal	12 meses
Negativa	40	29
Positiva	0	11

Quadro 14 – total 40 casos

De todas as mulheres com DS positiva, 32% (n=40) obteve um resultado negativo na citologia basal. Destas, após 12 meses, o resultado da citologia foi novamente negativo em 72% (n=29) e positivo em 28% (n=11).

A citologia basal foi positiva em 68% (n=83) das mulheres e em 12 meses, o resultado da citologia revelou-se negativo em 56% (n=46) e manteve-se positivo em 44% (n=37).

O quadro 15 representa a distribuição das citologias simples positivas em DS positivas; basal e 12 meses:

Citologia	Basal	12 meses
Negativa	0	46
Positiva	83	37

Quadro 15 – total 83 casos

DS positivas; positividade ao HPV:

O quadro 16 representa a distribuição da positividade do teste HPV em DS positivas; basal e 12 meses:

Teste HPV	Basal	12 meses
Negativo	0	47
Positivo	122	75

Quadro 16 – total 122 casos

Das 122 mulheres DS positivas, e que repetiram a citologia a 12 meses, 61% (75/122) mantiveram a infeção pelo HPV (16, 18 ou outros) e a infeção por HPV foi negativa em 39% (47/122) das mulheres.

Lesão de alto grau na biópsia e co-fatores associados

Para compreender quais os fatores que mais influenciam o resultado de lesão de alto grau na biópsia, fez-se uma análise mais pormenorizada, da demografia das 28 mulheres que apresentaram este resultado e os dados estão representados no quadro seguinte:

Idade	40±11 anos		
Menarca	13±2 anos		
Menopausa	4 casos em pós-menopausa 48±8 anos		
Paridade	Múltiparas 17/28	Nulíparas 6/28	Sem registo 5/28
Vacina contra HPV	Sim 0/28	Não 19/28	Sem registo 9/28
Tabagismo	Sim 9/28	Não 12/28	Sem registo 7/28
Início da vida sexual	18±3 anos		
Número de parceiros sexuais	5±6 parceiros		
Contraceção*	Hormonal 20/28	Não hormonal 3/28	Sem registo 4/28

*1 caso sem qualquer contraceção

Quadro 17 - Total 28 casos

Nesta amostra os co-fatores destacáveis são: a multiplicidade sexual com uma distribuição muito alargada, os métodos de contraceção hormonal e a vacinação.

Discussão

Nesta amostra da população feminina, submetida ao rastreio oportunístico do cancro do colo do útero, na consulta de ginecologia do hospital de Santa Maria, a avaliação observacional e os dados preliminares, permitiram verificar que em mulheres com indicação para análise posterior em colposcopia, 217 casos não foram recomendados imediatamente à intervenção em colposcopia. Todos os casos foram submetidos a triagem com citologia e dupla marcação com dois marcadores antigénicos (p16 e Ki67, parâmetros moleculares de indiferenciação celular) e nos casos positivos, a respetiva referenciação para colposcopia.

Nos 95 casos DS negativa, ocorreu em 12 meses: a redução dos casos com citologias positivas e a diminuição de casos com testes HPV positivos. As condições quer de citologia alterada, quer de teste HPV positivo foram reavaliadas e orientadas de acordo com os posteriores resultados obtidos.

Nas restantes 122 mulheres e com DS positiva, todas foram referenciadas para intervenção em colposcopia com 28 casos de HSIL na biópsia e 40 casos de LSIL. As restantes informações histopatológicas não foram relevantes.

As mulheres DS negativa tendencialmente têm idade superior e menos parceiros sexuais. Esta citação é corroborada pela corrente científica, na medida em que o determinante com maior importância na exposição à infeção pelo HPV é o número de parceiros sexuais (Collaboration et al., 2007; Zhang et al., 2020).

Adicionalmente, as neoplasias associadas aos tipos de HPV 16 e 18 (maior risco oncogénico), ocorrem em idades mais jovens, dado que os restantes genótipos apresentam uma progressão mais lenta (Jeronimo et al., 2017; Silvia de Sanjose; Cosette M. Wheeler; Wim G. V. Quint; William C. Hunt; Nancy E. Joste; Laia Alemany; F. Xavier Bosch; on behalf of the Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group; Evan R. Myers; and Philip E. Castle, 2015).

O mesmo se comprova no estudo de Wentzensen e colaboradores, que nas mulheres com HPV de alto risco e com lesão CIN2 ou superior, a positividade da DS é mais frequente em mulheres mais jovens (Wentzensen et al., 2012).

Nesta amostra mais de metade das mulheres não fez a vacina contra o HPV e as percentagens são muito semelhantes nos subgrupos DS negativa e positiva. Nos países com uma elevada taxa de vacinação, ocorreu uma redução das infeções pelo HPV, bem como, a presença de lesões precursoras de CCU (Wentzensen et al., 2017). Adicionalmente, Falcaro e colaboradores, refere que a vacinação das mulheres entre os 12 e 13 anos, diminuiu a incidência de CCU em 87% na Inglaterra. No entanto, a população vacinada ainda é jovem, por conseguinte, o impacto da vacinação ainda não pode ser bem estabelecido (Falcaro et al., 2021). Apesar da eficácia da vacina, é crucial não esquecer que o rastreio continuará a ser essencial para a prevenção do CCU nas décadas seguintes, pois, ainda existem mulheres sem vacinação (Wentzensen et al., 2017).

O tabagismo é um fator de risco conhecido, e importante para a carcinogénese (Zhang et al., 2020). Neste estudo efetuado, não foi possível através dos registos, estabelecer com segurança quantas mulheres eram fumadoras correntes. Constatou-se que, existe uma proporção ligeiramente menor de mulheres fumadoras nos resultados DS negativa. No entanto, a taxa de mulheres não fumadoras é praticamente igual em ambos os subgrupos, bem como, a indicação de sem registo. O resultado das fumadoras nos dois subgrupos foi superior à média nacional, sendo a prevalência ajustada de mulheres fumadoras em Portugal de 13% (ICO, 2021).

A média da menarca, foi semelhante em ambos os subgrupos. Consequentemente, pode depreender-se nesta amostra que não é um co-fator com relevância para o desenvolvimento de lesões pré-cancro. Fundamentando os dados obtidos, é de notar que, a menarca inferior a 13 anos de idade aumenta o risco de CCU, não sendo o fator de risco mais preponderante para a carcinogénese (Kashyap et al., 2019).

Relativamente à média da menopausa, foi idêntica nos dois subgrupos da análise, não se revelando como impacto significativo, apesar de que a menopausa tardia aumenta o tempo de exposição aos fatores de risco, e a imunidade diminui gradualmente após a menopausa (Wang et al., 2017).

O número crescente de parceiros sexuais e o início precoce da atividade sexual (inferior aos 20 anos) aumentam o risco de CCU (Kashyap et al., 2019). A média da idade de início da vida sexual em Portugal é de 19,5 anos (ICO, 2021). No subgrupo DS positiva, a média foi inferior em um ano relativamente ao subgrupo DS negativa (17 e 18 anos respetivamente). A média de parceiros sexuais no subgrupo DS positiva, foi superior e com distribuição mais alargada relativamente ao subgrupo DS negativa (5 ± 6 e 3 ± 2 parceiros respetivamente).

Existem dados que mostram que em Portugal, 48,3% das mulheres utiliza contraceção oral (ICO, 2021). De facto, a associação entre a utilização de contraceptivos orais combinados e o risco de neoplasia cervical é discutível (Vessey & Painter, 2006).

A contraceção hormonal tem consequências a nível do colo do útero, com a formação de epitélio colunar no exocérvix (ectropion), que aumenta conforme o tempo de utilização (Amália Pacheco; Ana Rosa Costa; António Lanhoso; Ana Teresa Almeida Santos; Carla Rodrigues; Cláudio Rebelo; Eunice Capela; Fernanda Águas; Fernanda Geraldes; Helena Solheiro; Isabel Martins; Isabel Santos Silva; Joaquim Neves; João Paulo Marques; Fátima, 2020). Dados de diferentes estudos demonstraram que o uso de contraceção hormonal oral, durante 5 anos, duplica o risco de CCU. Sendo que, se associado a infeção pelo HPV esse risco acresce 3 vezes mais. Comprovou-se que o risco diminui imediatamente com a cessação e estima-se que 10 anos depois, iguala o risco à não utilização de contraceção oral (Collaboration et al., 2007; Zhang et al., 2020).

Apesar dos contraceptivos orais combinados, serem classificados pela IARC como causa de CCU (Collaboration et al., 2007), existem outros co-fatores de risco que podem enviesar os resultados (Amália Pacheco; Ana Rosa Costa; António Lanhoso; Ana Teresa Almeida Santos; Carla Rodrigues; Cláudio Rebelo; Eunice Capela; Fernanda Águas;

Fernanda Geraldês; Helena Solheiro; Isabel Martins; Isabel Santos Silva; Joaquim Neves; João Paulo Marques; Fátima, 2020).

Os resultados desta análise corroboram os achados científicos: embora as percentagens relativas aos tipos de contraceção, praticados pelos dois subgrupos de mulheres, sejam muito próximos, reconhece-se nas mulheres DS negativa, menor referência à contraceção hormonal e a prática de contraceção não hormonal é maior, comparativamente às mulheres DS positiva.

Efetivamente, nos dois subgrupos deste estudo, verificou-se uma superioridade de mulheres múltiparas comparativamente às nulíparas. De facto, quanto maior o numero de filhos, maior o risco de CCU (Kashyap et al., 2019). Contudo, a multiparidade está associada a um aumento do risco de desenvolver neoplasia cervical em mulheres HPV positivas, portanto a sinergia é impulsionadora do risco (Muñoz et al., 2002).

Uma fração significativa da população será confrontada em algum ponto da vida, com a infeção por HPV. Apenas 10 a 15% irá desenvolver infeção persistente pois, a resolução espontânea da mesma é muito comum. A maior parte das infeções iniciais pelo HPV, desaparecem naturalmente em aproximadamente 1 a 2 anos, devido aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Deste modo, apenas numa percentagem reduzida de mulheres, a infeção tem potencial para progredir para neoplasia (Joseph A Westrich, Cody J Warren, 2017), (Stoler et al., 2007), (Wentzensen et al., 2012). Neste sentido, as mulheres com positividade para HPV e a DS foi negativa, não necessitam de ser referenciadas para a colposcopia e pode prolongar-se o acompanhamento até dois anos (Cuschieri et al., 2018). Na maioria, a infeção regrediu e o resultado das citologias foi predominantemente NILM (Clarke et al., 2019; Petry et al., 2011). As afirmações anteriores, revelam-se neste estudo, nomeadamente, quando se avaliaram os resultados das citologias, basais e ao fim de 12 meses, de ambos os subgrupos. Comprovou-se que, após um ano, a infeção por HPV é inexistente na maioria das mulheres (63/95) com DS negativa.

Da mesma forma, neste subgrupo, a generalidade das citologias basais era negativa (75/95) e esta fração aumentou para 63/75 em 12 meses.

Contudo, 20/95 apresentavam citologia basal positiva, sendo que, após um ano, 12/20 surgiram como negativas. Na prática, existe uma superioridade de resultados NILM, em mulheres com DS negativa, que se manteve na citologia ao fim de 12 meses.

De facto, a DS, tem a capacidade de reduzir as referenciações desnecessárias à colposcopia (Bergeron et al., 2015), pela elevada sensibilidade e especificidade para a deteção de lesões precursoras, revelando os respetivos valores preditivo negativo e preditivo positivo superiores (Wentzensen et al., 2015).

Por este motivo, nesta análise, mais de metade (68%) das citologias basais das mulheres com DS positiva, obtiveram um resultado igualmente positivo, que se manteve em 44% das mesmas, ao fim de 12 meses. Apesar da percentagem das citologias basais com resultado negativo ter sido inferior (32%), após 12 meses, a generalidade continuou negativa (72%).

A sensibilidade da DS é elevada para a deteção de lesões CIN2 ou superiores em mulheres com citologia ASC-US ou LSIL (Ikenberg et al., 2013; Schmidt et al., 2011). Detalhando melhor os resultados, nas citologias basais das mulheres com DS positiva, verificou-se a predominância de LSIL (51%). Este achado é similar em Wentzensen e colaboradores, que evidencia resultados idênticos e afirma que a positividade da DS, aumenta conforme evolui a categoria da citologia (Wentzensen et al., 2012).

De acordo com o rastreio aplicado, após um resultado DS positivo, as mulheres foram referenciadas para a consulta de colposcopia, na qual, 111 realizaram biópsia. Verificou-se que as percentagens predominantes corresponderam às lesões de baixo grau (36%) e de alto grau (25%). Da mesma forma, a evidência científica afirma existir um aumento proporcional de resultados DS positivos, conforme evoluiu a severidade do resultado histológico (Lewitowicz et al., 2020; Wentzensen et al., 2012).

A prevalência da infeção HPV diminui com a idade. Em Portugal, cerca de 20% das mulheres entre os 25 e 35 anos de idade apresentam infeção por HPV.

Adicionalmente, os genótipos 16 e 18 são mais frequentes à medida que se progride na severidade das lesões, sendo a prevalência superior em citologias HSIL e em neoplasias, do que em citologias NILM e LSIL. De facto, em citologias de baixo grau os genótipos mais frequentes não correspondem aos tipos 16 e 18, com a predominância de outros genótipos com risco oncogénico (ICO, 2021). Neste estudo, verificou-se uma superioridade da infeção por outros genótipos de HPV que não o 16 e 18 em ambos os subgrupos (DS negativa e DS positiva). No entanto, existem diferenças na relação com as alterações na citologia. No subgrupo DS negativa, a citologia mais prevalente foi NILM, para a infeção HPV outros. No subgrupo DS positiva, os resultados preponderantes foram LSIL e ASCUS para a infeção por HPV outros. A destacar o aumento da frequência da infeção por HPV 16, HPV16 + HPV outros e HPV18 + HPV outros, nos resultados do subgrupo DS positiva relativamente ao subgrupo DS negativa.

Em conformidade com o que foi discutido anteriormente, a contraceção hormonal, a idade e a vacina contra o HPV são fatores relevantes da progressão e desenvolvimento do CCU (Collaboration et al., 2007; Jeronimo et al., 2017; Wentzensen et al., 2017).

Relativamente à lesão de alto grau, pode afirmar-se que o tipo de contraceção demonstrou ser o fator mais preponderante, com 20/28 mulheres a realizarem contraceção hormonal em contraste com 3/28 que faziam contraceção não hormonal.

Quanto à idade, verificou-se que as mulheres com lesão de alto grau são tendencialmente mais novas.

A destacar que 19/28 mulheres com lesão de alto grau na biópsia não referiram a vacinação contra o HPV.

A média de parceiros sexuais das mulheres com lesão de alto grau na biópsia, é elevada e apresenta uma distribuição muito alargada (5 ± 6 parceiros).

Os hábitos tabágicos, não parecem ter muita relevância neste estudo, possivelmente devido às limitações dos registos. Contrariamente ao conhecimento científico, identificam-se 9/28 de mulheres fumadoras contra 12/28 não fumadoras com considerável referência de sem registo (7/28).

Existe uma limitação a argumentar nesta avaliação. As mulheres com DS negativa poderiam ser submetidas a avaliação em colposcopia para comprovar a ausência de necessidade de biópsia ou menos biópsias com resultados significativos. No entanto, a publicação de Clark e colaboradores (Clarke et al., 2019), revelou que na presença de DS negativa, a probabilidade de surgir uma lesão de alto grau em 3 anos é muito reduzida; as mulheres DS negativa tiveram uma avaliação em 12 meses.

Conclusão

Neste estudo observacional descritivo e retrospectivo, numa amostra de mulheres seguidas em consulta de ginecologia no CHLN unidade do hospital de Santa Maria, as quais realizaram rastreio oportunista para o CCU, preliminarmente conclui-se que:

- Na generalidade das mulheres com positividade para o HPV e DS negativa, a infeção espontaneamente negativou a 12 meses de reavaliação. Da mesma forma, a maioria das citologias basais negativas, assim permaneceram negativas em 12 meses. Adicionalmente, mais de metade das citologias basais positivas, negativou após o mesmo intervalo de tempo. Portanto, o facto destas mulheres não terem sido submetidas a consulta de colposcopia foi benéfico, quer para as mesmas, quer para a unidade de colposcopia, na medida em que reduziu a sobrecarga de consultas, colposcopias, e eventuais intervenções;
- Em alternativa, no subgrupo das mulheres com DS positiva, prevaleceram as citologias basais positivas, e assim se mantiveram após doze meses. Ademais, os resultados destas citologias apresentaram um predomínio de LSIL. As lesões de baixo e alto grau constituíram a superioridade dos resultados das biópsias. Depreende-se que estas mulheres, verdadeiramente necessitavam da consulta de colposcopia, pois efetivamente apresentavam maior risco de ter lesões precursoras de CCU.

Em suma, estes dados tendem a permitir afirmar que a DS consente uma triagem apropriada das mulheres com necessidade de colposcopia, em contexto de positividade para o HPV e citologias de baixo grau; possibilitou prolongar-se com segurança, durante um ano, a realização de colposcopia no outro subgrupo de mulheres.

Por conseguinte, contribuiu para a uma mudança de paradigma, tornando o rastreio do CCU mais eficiente, através da redução da morbilidade, evitando a realização de intervenções excedentárias, possibilitando uma diminuição do custo global no seguimento das mulheres e minimizando a ansiedade e iatrogenia associadas.

Bibliografia

- Amália Pacheco; Ana Rosa Costa; António Lanhoso; Ana Teresa Almeida Santos; Carla Rodrigues; Cláudio Rebelo; Eunice Capela; Fernanda Águas; Fernanda Geraldês; Helena Solheiro; Isabel Martins; Isabel Santos Silva; Joaquim Neves; João Paulo Marques; Fátima. (2020). Consenso sobre Contraceção. *Sociedade Portuguesa Da Contraceção*.
- Benevolo, M., Allia, E., Gustinucci, D., Rollo, F., Bulletti, S., Cesarini, E., Passamonti, B., Giovagnoli, M. R., Carico, E., Carozzi, F. M., Mongia, A., Fantacci, G., Confortini, M., Rubino, T., Fodero, C., Prandi, S., Marchi, N., Farruggio, A., Coccia, A., ... Montaguti, A. (2017). Interobserver reproducibility of cytologic p16INK4a/Ki-67 dual immunostaining in human papillomavirus-positive women. *Cancer Cytopathology*, 125(3), 212–220. <https://doi.org/10.1002/cncy.21800>
- Bergeron, C., Ikenberg, H., Sideri, M., Denton, K., Bogers, J., Schmidt, D., Alameda, F., Keller, T., Rehm, S., & Ridder, R. (2015). Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathology*, 123(6), 373–381. <https://doi.org/10.1002/cncy.21542>
- Clarke, M. A., Cheung, L. C., Castle, P. E., Schiffman, M., Tokugawa, D., Poitras, N., Lorey, T., Kinney, W., & Wentzensen, N. (2019). Five-Year Risk of Cervical Precancer Following p16/Ki-67 Dual-Stain Triage of HPV-Positive Women. *JAMA Oncology*, 5(2), 181–186. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.4270>
- Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A., & Denny, L. (2019). Cervical cancer. *The Lancet*, 393(10167), 169–182. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
- Collaboration, I., Studies, E., & Cancer, C. (2007). Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet*, 370(9599), 1609–1621. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61684-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61684-5)
- Cuschieri, K., Ronco, G., Lorincz, A., Smith, L., Ogilvie, G., Mirabello, L., Carozzi, F., Cubie, H., Wentzensen, N., Snijders, P., Arbyn, M., Monsonego, J., & Franceschi, S. (2018). Eurogin roadmap 2017: Triage strategies for the management of HPV-

- positive women in cervical screening programs. *International Journal of Cancer*, 143(4), 735–745. <https://doi.org/10.1002/ijc.31261>
- Falcaro, M., Castañon, A., Ndlela, B., Checchi, M., Soldan, K., Lopez-Bernal, J., Ellis-Brookes, L., & Sasieni, P. (2021). The effects of the national HPV vaccination programme in England, UK, on cervical cancer and grade 3 cervical intraepithelial neoplasia incidence: a register-based observational study. *The Lancet*, 398(10316), 2084–2092. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02178-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02178-4)
- GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC. (n.d.). Retrieved December 21, 2021, from <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>
- ICO. (2021). *Human Papillomavirus and Related Diseases Report*. October. www.hpvcentre.com
- Ikenberg, H., Bergeron, C., Schmidt, D., Griesser, H., Alameda, F., Angeloni, C., Bogers, J., Dachez, R., Denton, K., Hariri, J., Keller, T., Von Knebel Doeberitz, M., Neumann, H. H., Puig-Tintore, L. M., Sideri, M., Rehm, S., & Ridder, R. (2013). Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results of the PALMS study. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(20), 1550–1557. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt235>
- Jeronimo, J., Castle, P. E., Temin, S., Denny, L., Gupta, V., Kim, J. J., Luciani, S., Murokora, D., Ngoma, T., Qiao, Y., Quinn, M., Sankaranarayanan, R., Sasieni, P., Schmeler, K. M., & Shastri, S. S. (2017). Secondary prevention of cervical cancer: ASCO resource-stratified clinical practice guideline. *Journal of Global Oncology*, 3(5), 635–657. <https://doi.org/10.1200/JGO.2016.006577>
- Joseph A Westrich, Cody J Warren, D. P. (2017). Evasion of host immune defenses by HPV. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.023>.Evasion
- Kashyap, N., Krishnan, N., Kaur, S., & Ghai, S. (2019). Risk Factors of Cervical Cancer: A Case-Control Study. *Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing*, 6(3), 308–314. https://doi.org/10.4103/apjon.apjon_73_18
- Lewitowicz, P., Nasierowska-Guttmejer, A., Rokita, W., Adamczyk-Gruszka, O., Gluszek, S., Chrapek, M., Kolos, M., Wrona-Cyranowska, A., & Misiek, M. (2020). HPV genotyping and p16/Ki-67 test significantly improve detection rate of high-grade cervical squamous intraepithelial lesion. *Archives of Medical Science*, 16(1), 87–

93. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.80697>
- Moutinho, J. (2014). Consenso sobre infecção por HPV e neoplasia intraepitelial do colo vulva e vagina. *Sociedade Portuguesa de Ginecologia - Secção Portuguesa de Colposcopia e Patologia Cervico-Vulvovaginal*.
- Muñoz, N., Franceschi, S., Bosetti, C., Moreno, V., Herrero, R., Smith, J. S., Shah, K. V., Meijer, C. J. L. M., & Bosch, F. X. (2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet*, 359(9312), 1093–1101. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08151-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08151-5)
- Neves, J. (2019). Ginecologia Fundamental. In *Ginecologia Fundamental* (Lidel, pp. 39–59).
- Petry, K. U., Schmidt, D., Scherbring, S., Luyten, A., Reinecke-Lüthge, A., Bergeron, C., Kommos, F., Löning, T., Ordi, J., Regauer, S., & Ridder, R. (2011). Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecologic Oncology*, 121(3), 505–509. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2011.02.033>
- Schmidt, D., Bergeron, C., Denton, K. J., & Ridder, R. (2011). P16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathology*, 119(3), 158–166. <https://doi.org/10.1002/cncy.20140>
- Silvia de Sanjose; Cosette M. Wheeler; Wim G. V. Quint; William C. Hunt; Nancy E. Joste; Laia Alemany; F. Xavier Bosch; on behalf of the Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group; Evan R. Myers; and Philip E. Castle. (2015). *Age-specific occurrence of HPV16- and HPV18-related cervical cancer*. 22(7), 1313–1318. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0053>.
- Stoler, M. H., Castle, P. E., Solomon, D., & Schiffman, M. (2007). The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP-guided management requires the use of well-validated assays. *American Journal of Clinical Pathology*, 127(3), 335–337. <https://doi.org/10.1309/RNF3C01JKADQCLKP>
- Vessey, M., & Painter, R. (2006). *Oral contraceptive use and cancer . Findings in a large cohort study , 1968 – 2004*. 385–389. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603260>
- Wang, Z., Wang, J., Fan, J., Zhao, W., Yang, X., Wu, L., Li, D., Ding, ling, Wang, W., Xu, J., Stram, M., Zhao, C., & Hao, M. (2017). Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Chinese women: Large study in Jiexiu, Shanxi

- Province, China. *Journal of Cancer*, 8(5), 924–932.
<https://doi.org/10.7150/jca.17416>
- Wentzensen, N., Arbyn, M., Berkhof, J., Bower, M., Canfell, K., Einstein, M., Farley, C., Monsonego, J., & Franceschi, S. (2017). Eurogin 2016 Roadmap: how HPV knowledge is changing screening practice. *International Journal of Cancer*, 140(10), 2192–2200. <https://doi.org/10.1002/ijc.30579>
- Wentzensen, N., Fetterman, B., Castle, P. E., Schiffman, M., Wood, S. N., Stiemerling, E., Tokugawa, D., Bodelon, C., Poitras, N., Lorey, T., & Kinney, W. (2015). p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(12), djv257.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djv257>
- Wentzensen, N., Fetterman, B., Tokugawa, D., Schiffman, M., Castle, P. E., Wood, S. N., Stiemerling, E., Poitras, N., Lorey, T., & Kinney, W. (2014). Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki-67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. *Cancer Cytopathology*, 122(12), 914–920.
<https://doi.org/10.1002/cncy.21473>
- Wentzensen, N., Schwartz, L., Zuna, R. E., Smith, K., Mathews, C., Gold, M. A., Allen, R. A., Zhang, R., Dunn, S. T., Walker, J. L., & Schiffman, M. (2012). Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clinical Cancer Research*, 18(15), 4154–4162.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0270>
- Zhang, S., Xu, H., Zhang, L., & Qiao, Y. (2020). Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chinese Journal of Cancer Research*, 32(6), 720–728.
<https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.05>