

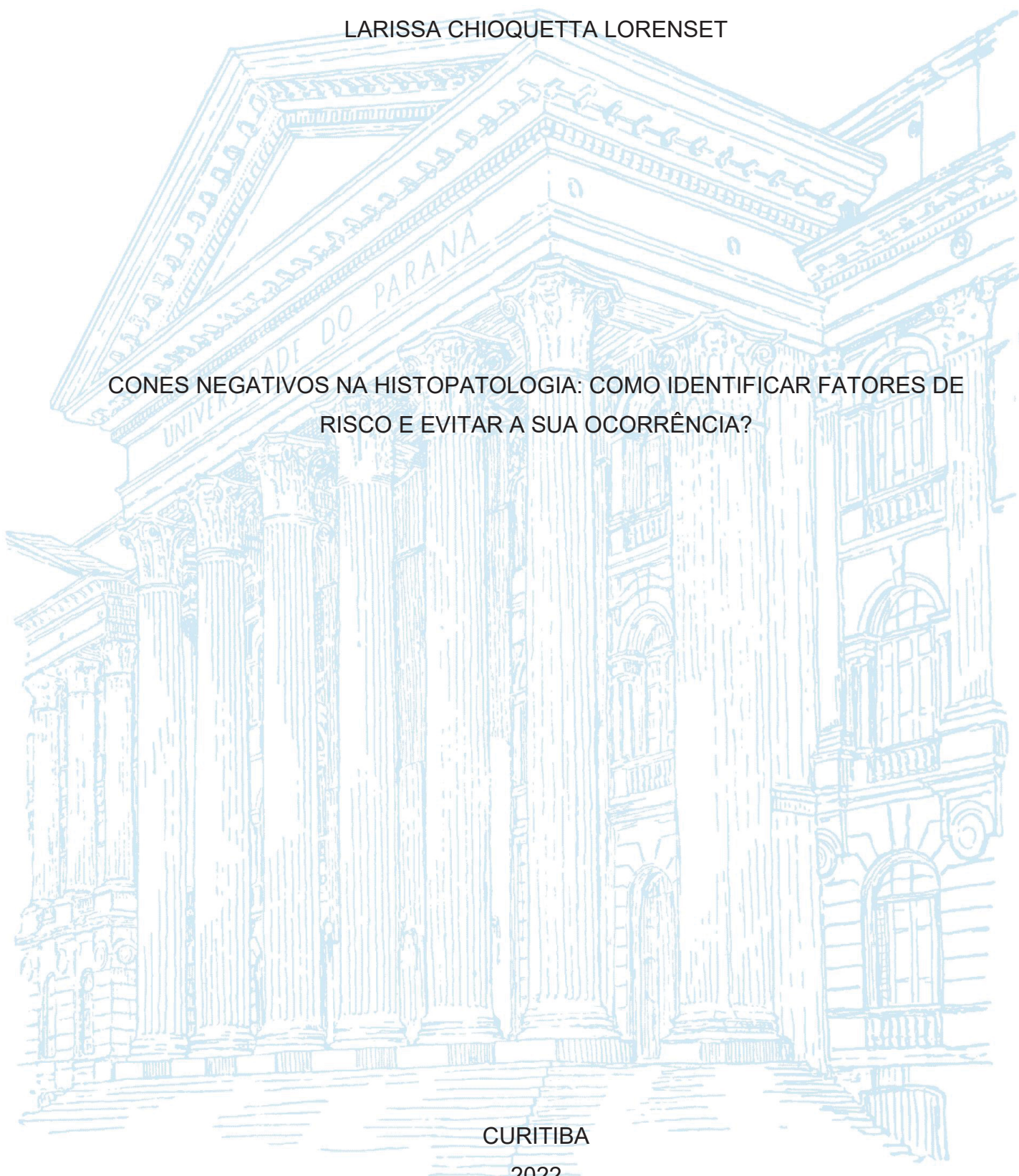
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA CHIOQUETTA LORENSET

CONES NEGATIVOS NA HISTOPATOLOGIA: COMO IDENTIFICAR FATORES DE RISCO E EVITAR A SUA OCORRÊNCIA?

CURITIBA

2022



LARISSA CHIOQUETTA LORENSET

CONES NEGATIVOS NA HISTOPATOLOGIA: COMO IDENTIFICAR FATORES DE
RISCO E EVITAR A SUA OCORRÊNCIA?

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Tocoginecologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Maira Zanine

CURITIBA

2022

L868 Lorenset, Larissa Chioquetta

Cones negativos na histopatologia: como identificar fatores de risco e evitar a sua ocorrência? [recurso eletrônico] / Larissa Chioquetta Lorenset. -- Curitiba, 2022.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Profa. Dra. Rita Maira Zanine

1. Papillomaviridae. 2. Conização. 3. Neoplasia Intraepitelial Cervical.
4. Resultados negativos. 5. Antígeno Ki-67. I. Zanine, Rita Maira.
II. Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.
III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO TOCOGINECOLOGIA E
SAÚDE DA MULHER - 40001016084P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação TOCOGINECOLOGIA E SAÚDE DA MULHER da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LARISSA CHIOQUETTA LORENSET** intitulada: **Cones negativos na histopatologia: Análise de fatores de risco e de recorrência para lesão de alto grau**, sob orientação da Profa. Dra. RITA MAIRA ZANINE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Outubro de 2022.

Assinatura Eletrônica
23/10/2022 15:25:11.0
RITA MAIRA ZANINE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
21/10/2022 18:45:02.0

ANA PAULA MARTINS SEBASTIAO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/10/2022 09:28:28.0

SHELDON RODRIGO BOTOGOSKI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ-
CURITIBA)

Assinatura Eletrônica
23/10/2022 17:50:14.0

IRIS RABINOVICH

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Rossaly e Ivor, que sempre me apoiaram nas minhas diversas aventuras acadêmicas.

Ao meu esposo Rafael, que sempre compreendeu meus períodos de imersão nos estudos, e que me incentiva constantemente em meu desenvolvimento profissional.

À minha filha Olívia, que me antes mesmo de nascer, ainda na vida intrauterina, me acompanha e me instiga a ser cada vez melhor.

Aos meus irmãos, Caroline e Junior, pelo companheirismo e pela torcida nos “bastidores” da vida.

A todos os pesquisadores que, através do seu árduo trabalho, permitem que a ciência seja difundida pelo mundo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Rita Maira Zanine que, desde a residência médica, se tornou uma grande mentora e conselheira da Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia e também da vida. Agradeço por compartilhar tanto conhecimento, por me guiar nesta grande jornada de aprendizado, por me amparar durante o percurso e seus percalços, por sempre ter acreditado em mim e no meu potencial e por me abrir tantas portas profissionais.

À Dra Ana Paula Percicote, pela dedicação e suporte com o grande trabalho de revisar as centenas de lâminas necessárias para que este projeto tivesse tal qualidade.

À Dra Sue Hellen de Oliveira Munhos, que se dispôs a revisar as lâminas divergentes com paciência e dedicação.

Aos funcionários do Setor de Arquivo Médico pela separação de tantos prontuários.

Aos funcionários do Serviço de Anatomia Patológica pela separação das lâminas e blocos, recortes, e aplicação de imuno-histoquímica.

Às pacientes do ambulatório de Patologia do Trato Genial Inferior e Colposcopia que permitiram com que, através de suas doenças, extraíssemos conhecimento.

“Eu quero ser tudo que sou capaz de me tornar.”

(Katherine Mansfield)

RESUMO

Introdução: A conização cervical é uma importante e eficaz forma de tratar lesões precursoras de câncer de colo de útero. Entretanto, resultados de conizações negativas para lesão de alto grau não são infrequentes na prática clínica, e atualmente não há nenhum protocolo específico para tratar e seguir estas pacientes. O objetivo da presente pesquisa foi analisar as taxas de cones negativos e identificar possíveis fatores de risco e recorrência para este grupo de pacientes. **Materiais e métodos:** Estudo retrospectivo e observacional, com análise de pacientes com conização negativa (definida como ausência de malignidade e neoplasia intraepitelial de baixo grau) realizados de janeiro de 2010 até dezembro de 2020. Não houve restrição quanto ao tipo de técnica cirúrgica utilizada ou quanto à indicação do procedimento. Após a revisão das lâminas de biópsias, quando realizadas, e das conizações, as pacientes que permaneceram com resultado negativo foram submetidas a novos recortes profundos dos blocos de parafina. Três marcadores de imuno-histoquímica (IHQ) foram aplicados: p16, Ki-67 e geminina. Os dados foram comparados com um grupo controle de 29 cones positivos. **Resultados:** De 1022 conizações realizadas no período estudado, 186 foram negativas (18,19%). 35 pacientes não preencheram os critérios de inclusão e 151 casos foram selecionados para o estudo. Após a revisão histopatológica das lâminas, 4 pacientes foram excluídas por apresentarem resultados falso positivos. As 147 pacientes restantes tiveram as lâminas das conizações revisadas, com 16 resultados falso negativos (10,88%). 131 casos foram submetidos a novos recortes, com diagnóstico de 9 lesões de alto grau não amostradas antes. As 122 pacientes restantes foram definidas como cones verdadeiramente negativos (11,93%), e foram submetidas à IHQ. O p16 foi positivo para 20,49% dos casos, o Ki-67 foi majoritariamente pouco expressivo e a geminina teve resultados variáveis, tendendo à coloração fraca (<3+) em mais de 50% dos casos de cones negativos. Comparando os casos com o grupo controle, pacientes com idade maior e maior número de gestações tiveram mais risco de terem cones negativos, assim como padrão de IHQ com p16 negativo, Ki-67 baixo, e expressão mais baixa de geminina ($p < 0,05$). Houve apenas 10 recidivas para lesão de alto grau, sem identificação de fatores de risco com significância estatística. **Conclusão:** A taxa de conizações negativas foi de 11,93%. Fatores de risco foram maior idade, maior número de gestações e baixa expressão de p16, Ki-67 e de geminina ($p < 0,05$), sem poder de prever recorrência. As recidivas representaram 8,19% dos cones negativos, sem identificação de fatores de risco com significância estatística. O tamanho da lesão colposcópica e a realização de biópsia pré procedimento não tiveram relação com ausência de lesão nas conizações. As pacientes sem doença morfológica no anatomopatológico, mas com marcador IHQ positivo não apresentaram maior recidiva de doença.

Palavras-chave: Papiloma Vírus Humano (HPV), Conização, Neoplasia Intraepitelial Cervical, Resultados Negativos, P16, Antígeno Ki-67, Geminina

ABSTRACT

Introduction: Cervical conization is an important and effective option to treat precancerous cervical lesions. However, negative conization results for high-grade lesions are not uncommon in the clinical practice, and there is currently no specific protocol to treat and to follow-up these patients. The aim of the present research was to analyze the rates of negative cones and to identify possible risk and recurrence factors for this group of patients. **Materials and methods:** Retrospective and observational study, with analysis of patients with negative conization (defined as absence of lesion and low-grade intraepithelial neoplasia) performed from January 2010 to December 2020. There was no restriction regarding the type of surgical technique or the indication for the procedure. After the review of the biopsy slides, when performed, and conizations slides, patients who remained with a negative result underwent deep sectioning levels of the paraffin blocks. Three immunohistochemical (IHC) markers were applied: p16, Ki-67 and geminin. Data were compared with a control group of 29 positive cones. **Results:** Of 1022 conizations performed during the study period, 186 were negative (18.19%). 35 patients did not meet the inclusion criteria and 151 cases were selected for the study. After the histopathological review of the slides, 4 patients were excluded due to false positive results. The remaining 147 patients had their conization slides reviewed, with 16 false negative results (10.88%). 131 cases were submitted to deep sectioning levels, with a new diagnosis of 9 high-grade lesions not previously sampled. The remaining 122 patients were defined as truly negative cones (11.93%) and were submitted to IHC. p16 was positive in 20.49% cases, Ki-67 was mostly not expressive and geminin had variable results, with tendency to stain weakly (<3+) in more than 50% of the negative cone cases. Comparing the cases with the control group, patients with older age and more pregnancies are at greater risk of having negative cones, as well as an IHC pattern with negative p16, low Ki-67, and lower expression levels of geminin ($p < 0.05$). There were only 10 recurrences for high-grade lesions, with no identification of risk factors with statistical significance. **Conclusion:** The rate of negative conizations was 11.93%. Risk factors were older age, greater number of pregnancies and low expression of p16, Ki-67 and geminin ($p < 0.05$), with no power to predict recurrence. Recurrences represented 8.19% of the negative cones, without identification of risk factors with statistical significance. The size of the colposcopic lesion and the performance of a pre-procedure biopsy were not related to the absence of lesion in conizations specimens. Patients without morphological disease in the anatomopathological examination, but with a positive IHC marker did not present greater disease recurrence.

Keywords: Human Papilloma Virus (HPV), Conization, Cervical Intraepithelial Neoplasia, Negative Results, p16, Ki-67 Antigen, Geminin

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PAPEL DAS PROTEÍNAS E6 E E7 NA CARCINOGENESE.....	22
FIGURA 2 – COLO UTERINO COM ACHADOS MENORES.....	24
FIGURA 3 – COLO UTERINO COM ACHADOS MAIORES	24
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ZONAS DE TRANSFORMAÇÃO TIPOS 1, 2 E 3 RESPECTIVAMENTE	25
FIGURA 5 – EZT POR CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA COM ELETRODO EM ALÇA (CAF).	32
FIGURA 6 – EZT POR CONIZAÇÃO COM BISTURI A FRIO.....	32
FIGURA 7 - RECORTE RADIAL DO CONE.....	45
FIGURA 8 - CONIZAÇÕES CERVICAIS.....	50
FIGURA 9 - EXCLUSÕES DO ESTUDO	50
FIGURA 10 - AFUNILAMENTO DO ESTUDO	52
FIGURA 11 - EXPRESSÃO DO P16.....	62
FIGURA 12 - EXPRESSÃO DO KI-67.....	63
FIGURA 13 - EXPRESSÃO DA GEMININA.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - O SISTEMA DE BETHESDA.....	23
TABELA 2 - TERMINOLOGIA COLPOSCÓPICA DO COLO UTERINO IFPCPC 2011	25
TABELA 3 - IHQ DOS CONES NEGATIVOS.....	53
TABELA 4 - IHQ - COMPARAÇÃO ENTRE AUSÊNCIA DE NEOPLASIA X NIC 1 ..	54
TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES COM CONES NEGATIVOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS).....	54
TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES COM CONES NEGATIVOS (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS).....	55
TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES COM RECIDIVA (VARIÁVEIS CONTÍNUAS).....	57
TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES COM RECIDIVA (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS).....	57
TABELA 9 - COMPARAÇÃO DE CONES NEGATIVOS VS. CONTROLES (VARIÁVEIS CONTÍNUAS).....	59
TABELA 10 - COMPARAÇÃO DE CONES NEGATIVOS VS. CONTROLES (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AGC	- Atipia de células glandulares
ASCUS	- Atipia de células escamosas de significado indeterminado
ASCH	- Atipia de células escamosas, não podendo afastar lesão de alto grau
CAAE	- Certificado de apresentação de apreciação ética
CAF	- Cirurgia de alta frequência
CEC	- Carcinoma de células escamosas
CHC-UFPR	- Complexo Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CIS	- Carcinoma <i>in situ</i>
DIU	- Dispositivo intra-uterino
EZT	- Exérese da zona de transformação
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HPV	- Vírus do papiloma humano
HPV-AR	- HPV de alto risco
IARC	- International Agency for Research on Cancer
IFCPC	- International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy
IHQ	- Imuno-histoquímica
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
IST	- Infecções sexualmente transmissíveis
JEC	- Junção escamo-colunar
NIC	- Neoplasia intraepitelial cervical
NIVa	- Neoplasia intraepitelial vaginal
OMS	- Organização Mundial de Saúde
pRb	- Proteína do Retinoblastoma
PTGIC	- Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia
SOE	- Sem outras especificações
SWETZ	- Cirurgia de alta frequência com eletrodo reto
ZT	- Zona de transformação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
4 REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1 PATOGÊNESE/ONCOGÊNESE	18
4.2 DIAGNÓSTICO	22
4.3 TRATAMENTO.....	30
4.4 CONIZAÇÕES NEGATIVAS	33
4.5 PREVENÇÃO	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 DESENHO DO ESTUDO	41
5.2 OBTENÇÃO E DEFINIÇÃO DOS DADOS	42
5.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	44
5.4 ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA.....	45
5.5 REVISÃO DOS ESPÉCIMES.....	47
5.6 GRUPO CONTROLE	49
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
6 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	50
6.1 DAS BIÓPSIAS PRÉ PROCEDIMENTO.....	51
6.2 DAS CONIZAÇÕES:	51
6.3 DA IMUNO-HISTOQUÍMICA	53
6.4 DOS 122 CONES NEGATIVOS	54
6.5 COMPARAÇÃO ENTRE CONES NEGATIVOS E GRUPO CONTROLE	58
7 DISCUSSÃO	65
7.1 LIMITAÇÕES.....	69
7.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	70
8 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICE 1 – TABELA DE REVISÃO DE ARTIGOS	77
APÊNDICE 2 – ARTIGO PUBLICADO	78
ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	83

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o GLOBOCAN, no ano de 2020, houve uma estimativa de 604.000 novos casos de câncer cervical no mundo, com 342.000 mortes pela doença, tornando-se este o quarto câncer mais frequentemente diagnosticado e a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres (SUNG et al., 2021). Especificamente no Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para novos casos de câncer de colo do útero para o ano de 2022 é de 16.710. Os últimos dados disponíveis sobre mortalidade, de 2020, mostram que o número de óbitos contabilizados por esta causa foi de 6.627. Para o sexo feminino, este tipo de câncer ocupa o 3º lugar em incidência e o 4º lugar em mortalidade (“INCA”, 2022).

Uma das descobertas mais importantes na investigação etiológica do câncer de colo uterino nas últimas décadas foi a demonstração de sua associação com o vírus do papiloma humano (HPV). Harald zur Hausen demonstrou em 1983 que o câncer cervical é causado por certos tipos de HPV, cujos genes são incorporados ao DNA das células hospedeiras. A descoberta do potencial oncogênico do vírus abriu caminho para diversos outros estudos, inclusive para o desenvolvimento da vacina contra o HPV. As evidências científicas acumuladas a partir de estudos virológicos, moleculares, clínicos e epidemiológicos subsequentes demonstraram que o câncer do colo do útero é uma seqüela de uma infecção não resolvida a longo prazo por certos tipos de HPV (CASTELLSAGUÉ, 2008; ZUR HAUSEN, 2002).

O câncer do colo do útero parece ser a doença mais apropriada para a aplicação dos princípios de triagem (DASARI; WUDAYAGIRI; VALLURU, 2015). As lesões pré-cancerosas do colo do útero, chamadas de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), podem ser detectadas através de rastreamento e podem ser tratadas para evitar a progressão para o câncer. Assim, esta neoplasia é evitável devido ao seu longo estágio pré-invasivo (HUH, 2009). Para o rastreamento, o esfregaço de Papanicolaou é o método mais frequentemente usado e mais fácil para avaliar as células do colo do útero. A amostra é obtida a partir da junção escamocolumnar (JEC), inserindo e girando uma espátula através do orifício cervical externo e uma escova no interior do canal cervical. O esfregaço é então fixado em uma lâmina, adequadamente corado e analisado sob um microscópio. Nos últimos anos, foi desenvolvido um novo tipo de avaliação das células, através da citologia líquida, que

permitiu a otimização da qualidade das amostras ao produzir camadas celulares idênticas, diminuindo os espécimes de baixa qualidade (WANG; HUANG; ZHANG, 2018).

A taxa de pico da infecção pelo HPV é observada em mulheres com menos de 25 anos de idade, com um declínio que atinge os platôs entre 30 e 35 anos. Em alguns países, há um ligeiro aumento nas mulheres com mais de 50 anos (MOSCICKI et al., 2012). Desta forma, as Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero de 2016 recomendam o rastreio com citologia oncótica dos 25 aos 64 anos, uma vez por ano e, após dois exames anuais consecutivos negativos, a cada três anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2016). Já a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a triagem de mulheres de 30 a 49 anos através de testes de Papanicolaou a cada 3 a 5 anos ou através de pesquisa de HPV a cada 5 anos (BRAY et al., 2018).

Há necessidade de tratar estas lesões cervicais de alto grau em pacientes acima de 25 anos para impedir sua progressão, já que a partir desta idade a taxa de regressão espontânea é baixa. O tratamento em mulheres na idade reprodutiva demonstrou associação com aumento de morbidade obstétrica e neonatal. Assim, torna-se imprescindível reduzir as intervenções no colo do útero em mulheres jovens, ponderando as consequências em seu futuro obstétrico (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

A conização cervical é um procedimento cirúrgico realizado no diagnóstico e tratamento de lesões precursoras de câncer de colo do útero, indicado em um determinado grupo de pacientes conforme resultados de exames de citologia oncológica, colposcopia e/ou biópsia cervical. Apesar de simples e amplamente realizado em todo o mundo, não é um procedimento isento de complicações. Possíveis riscos são: infecção, sangramento, estenose de canal (que pode levar a infertilidade e hematometra) e principalmente desfechos obstétricos futuros desfavoráveis, como abortos, incompetência istmo-cervical, rotura prematura de membranas ovulares e trabalho de parto prematuro.

Um resultado negativo de conização é frustrante tanto para a paciente quanto para o médico, gerando incertezas quanto ao diagnóstico inicial, necessidade de tratamento e realização e tempo de seguimento. Dessa maneira, a identificação de fatores de risco envolvidos no resultado para conizações negativas poderá evitar procedimentos desnecessários, minimizando o impacto social, psíquico, físico e obstétrico destas pacientes e ainda gerando economia de despesas em saúde pública. Ademais, um novo biomarcador, ainda pouco estudado nas neoplasias intraepiteliais cervicais, será avaliado quanto ao comportamento em cones negativos e quanto à predição de recidiva para as doenças do colo do útero. Finalmente, espera-se esclarecer o significado das pacientes sem doença morfológica, porém com marcadores positivos.

Até o momento, não existem protocolos estabelecidos sobre o manejo de cone negativo. Portanto através deste estudo, o médico assistente terá embasamento para planejar o seguimento clínico da paciente, informar predição de recidiva de cones negativos e principalmente saber identificar fatores de risco para evitar um procedimento cirúrgico desnecessário.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a taxa de conizações negativas do serviço, bem como analisar os fatores de risco e recidiva envolvidos para este resultado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar ocorrência de recidivas pós cones negativos e seus fatores predisponentes;
- b) Verificar a associação do tamanho da lesão colposcópica e a ausência de doença na peça de cone;
- c) Analisar o papel da biópsia pré-procedimento na taxa de conização negativa;
- d) Avaliar a reação de p16 e Ki-67 nas pacientes com cone negativo;
- e) Verificar o comportamento da geminina nos cones negativos e o seu papel em predizer risco de recorrência de doença;
- f) Definir o significado clínico da paciente sem doença morfológica no anatomopatológico, mas com marcador imuno-histoquímico positivo.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PATOGÊNESE/ONCOGÊNESE

Na história natural do câncer do colo do útero, há um longo período de lesões precursoras assintomáticas, conhecidas como NIC (neoplasia intraepitelial cervical) 2-3, ou lesões de alto grau. Se diagnosticadas a tempo e tratadas adequadamente, apresentam excelentes taxas de cura (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2016).

Os estudos epidemiológicos e clínicos que incorporaram técnicas de biologia molecular de alta sensibilidade detectaram HPVs oncogênicos ou de alto risco em praticamente 100% dos cânceres cervicais (CASTELLSAGUÉ, 2008; WALBOOMERS et al., 1999). As associações observadas entre a infecção pelo HPV e o câncer do colo do útero estão entre as mais altas já identificadas na cancerologia humana (cerca de 99,7%), com um crescente consenso em qualificar o HPV como a “causa necessária” (ausência de doença na ausência de infecção), embora insuficiente (presença de infecção sem presença de doença) para este câncer (WALBOOMERS et al., 1999). Nos Estados Unidos, os tipos de vírus oncogênicos mais comumente encontrados nos cânceres, em ordem decrescente de frequência, são 16, 18, 31, 33 e 45. O HPV 16 é o tipo oncogênico mais prevalente, exclusivamente cancerígeno, responsável por mais da metade de todos os tumores, enquanto que o HPV 18 representa aproximadamente 20% deles (HUH, 2009; MOSCICKI et al., 2012; TORNESELLO et al., 2013). As principais etapas da carcinogênese cervical incluem: infecção do epitélio da zona de transformação cervical com tipos oncogênicos de HPV, persistência viral, progressão clonal do epitélio persistentemente infectado para pré-câncer cervical e invasão (MOSCICKI et al., 2012).

A junção escamocolunar (JEC) é uma linha definida pela transição abrupta entre os epitélios escamoso e colunar do colo uterino. É a área mais vulnerável à infecção pelo HPV e é o local em que mais de 90% das neoplasias do trato genital inferior são iniciadas. No período reprodutivo, pela influência do estrogênio e do crescimento do colo, o epitélio colunar da parte inferior do canal endocervical pode evertir-se, numa alteração denominada ectopia. Com o tempo, há uma substituição fisiológica do epitélio colunar evertido por um epitélio escamoso recém-formado –

processo chamado de metaplasia escamosa – e assim uma nova JEC é formada. Como a metaplasia é um processo de replicação e diferenciação celular, torna-se um local apropriado para a persistência viral. Visto que há dois tipos de células epiteliais, duas formas diferentes de câncer podem ocorrer no colo do útero: o adenocarcinoma, responsável por 10 a 20% dos casos, e muito mais frequentemente, o carcinoma de células escamosas (CEC) (MOSCICKI et al., 2012; SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004; WANG; HUANG; ZHANG, 2018).

A infecção pelo HPV é uma doença sexualmente transmissível. Assim, os fatores de risco associados a essa infecção estão claramente relacionados ao comportamento sexual do indivíduo. Os mais importantes são: sexarca precoce, alto número de parceiros sexuais ao longo da vida, e contatos sexuais com indivíduos de alto risco. Vários estudos descobriram a idade da primeira relação sexual como fator de risco para este câncer (CASTELLSAGUÉ, 2008).

O período prolongado entre a infecção e o desenvolvimento do câncer deixa dúvidas sobre os muitos fatores que contribuem para a progressão da doença, mas os determinantes bem conhecidos são: tipo viral, persistência da infecção, carga viral, integração do DNA viral ao DNA celular, uso prolongado de contraceptivos orais, alta paridade e tabagismo. A imunossupressão duradoura representa um importante fator de risco para persistência do DNA viral e progressão das lesões (ZUR HAUSEN, 2002). Assim, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) também constitui um importante fator de risco para a infecção pelo HPV e para a progressão neoplásica, principalmente durante os períodos de imunossupressão (CASTELLSAGUÉ, 2008).

O ciclo de vida do papilomavírus difere de todas as outras famílias de vírus: a infecção requer a disponibilidade de células epiteliais epidérmicas ou da mucosa que ainda são capazes de proliferar (células da camada basal) (ZUR HAUSEN, 2002). O HPV infecta o epitélio cervical sem entrar na circulação e sem uma fase virêmica, portanto não é facilmente exposto ao sistema imunológico, que é fundamental no controle dessas infecções. O vírus possui alguns mecanismos para evitar o sistema imunológico, produzindo um ambiente imunossupressor local que estabelece uma rede imunossupressora e bloqueia a resposta imune antitumoral. Esse microambiente pode incentivar a persistência do vírus e levar ao câncer do colo do útero (WANG; HUANG; ZHANG, 2018). Como resultado, a vigilância imune típica, que envolve o deslocamento de células imunes especializadas do local da

infecção para os órgãos linfóides secundários, é limitada ou evitada. Esse é um dos mecanismos do vírus para escapar da ativação e expansão da resposta imune (HUH, 2009).

A persistência do HPV oncogênico pode levar ao desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e câncer cervical – processo que pode demorar bastante tempo. Foi demonstrado que a infecção pelo HPV oncogênico persiste por mais tempo, com duração média de aproximadamente 8 meses, enquanto a duração média da infecção por tipos não oncogênicos é estimada em 4,8 meses. Após a infecção e a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, o ciclo de vida do HPV progride sinergicamente com a maturação da célula epitelial (HUH, 2009).

4.1.1 Genes do HPV

Os HPV têm genomas de DNA de fita dupla circulares e, apesar de seu pequeno tamanho, apresentam uma biologia molecular muito complexa. Os genes iniciais (*early*) do HPV têm potencial oncogênico e são responsáveis pela transcrição, replicação e transformação virais da célula hospedeira, enquanto os genes tardios (*late*) codificam proteínas estruturais do vírus. As proteínas tardias L1 e L2 são ativamente expressas nas camadas cornificadas que compõem o capsídeo viral, onde os genomas virais recém-sintetizados são encapsulados e os vírions são eliminados (DE VILLIERS et al., 2004; TORNESELLO et al., 2013). Três genes iniciais possuem atividade estimuladora da proliferação e transformação: E5, E6 e E7. O E5 não é obrigatório em eventos tardios da carcinogênese mediada por HPV. Um papel mais significativo para a transformação maligna é atribuído aos genes E6 e E7, que são expressos consistentemente no tecido displásico, e a inibição de sua expressão bloqueia o fenótipo maligno das células cancerígenas cervicais. (DE VILLIERS et al., 2004; ZUR HAUSEN, 2002). A instabilidade genética e o acúmulo de mutações induzidos por E6 e E7 leva à ativação de oncogenes e à inativação de genes supressores de tumores, assim, podem modificar o controle do ciclo celular e regular a apoptose (SENBA; MORI, 2012; WANG; HUANG; ZHANG, 2018).

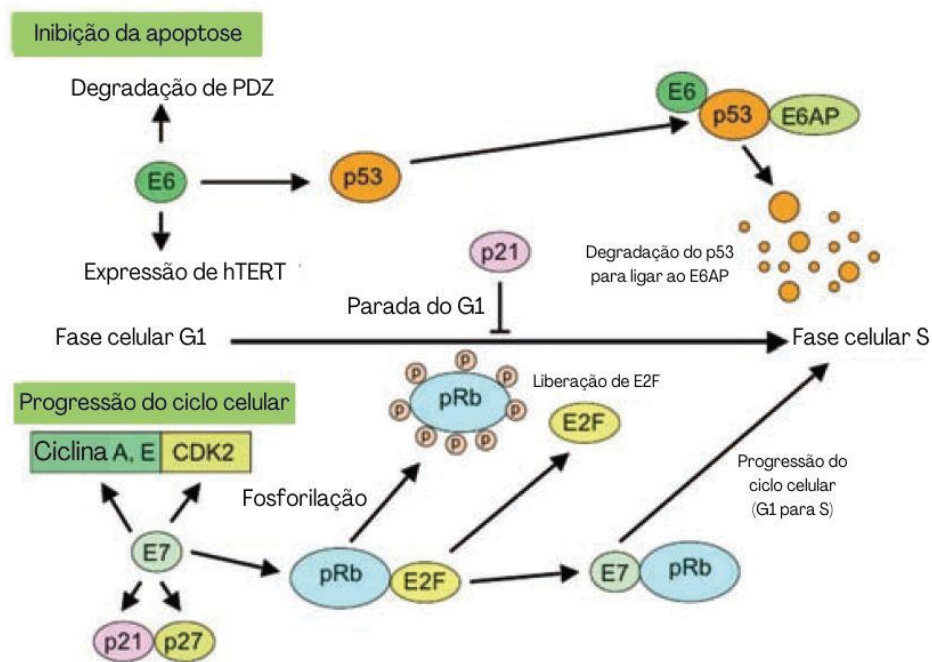
A proteína E6 incentiva a degradação da proteína p53, que regula o ciclo celular e que é responsável pela apoptose. A concentração de p53 nas células com E6 é cerca de 2 a 3 vezes menor do que nas células saudáveis, e sua meia-vida também é substancialmente diminuída. Como resultado, a resposta típica da p53 a

danos no DNA não ocorre, então as mutações são transportadas de uma geração celular para a seguinte, culminando com um acúmulo ao longo do tempo. Além disso, a E6 interfere com outras proteínas pró-apoptóticas, como Bak, FADD e procaspase-8 (SENBA; MORI, 2012; WANG; HUANG; ZHANG, 2018; ZUR HAUSEN, 2002).

Por sua vez, a proteína E7 se relaciona com a proteína do Retinoblastoma (pRb), e essa interação libera o fator E2F, que age na transição da fase celular e suprime o controle do ciclo realizado pela pRb. A E7 também se liga aos inibidores da CDK, p27 e p21, anulando a inibição do ciclo celular. Assim, a probabilidade de progressão maligna aumenta (SENBA; MORI, 2012; WANG; HUANG; ZHANG, 2018).

Além disso, as proteínas E6 e E7 também podem controlar os micro-RNAs, cuja desregulação está ligada ao início, desenvolvimento e disseminação de tumores humanos (WANG; HUANG; ZHANG, 2018). Deste modo, podem imortalizar vários tipos de células humanas independentemente, porém um efeito complementar e sinérgico entre elas resulta em um aumento acentuado na atividade e na eficiência de transformação. Em suma, essa interação entre E6 e E7 com p53 e pRb resulta em imortalização da célula, transformação e carcinogênese devido à sua desregulação do ciclo celular e do controle da apoptose (SENBA; MORI, 2012; TORNESELLO et al., 2013). Finalmente, as alterações patológicas induzidas pela expressão de E6 e E7 são histologicamente caracterizadas como NIC (HUH, 2009). A figura 1 exemplifica a ação das proteínas E6 e E7.

FIGURA 1 – PAPEL DAS PROTEÍNAS E6 E E7 NA CARCINOGENESE



FONTE: adaptada de SENBA; MORI, 2012.

4.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de uma neoplasia intraepitelial cervical está alicerçado no tripé clássico, que consiste em: citologia, colposcopia e histologia. A suspeita de uma lesão de alto grau surge na citologia. A citologia convencional tem uma alta especificidade (79-100%) e uma sensibilidade aceitáveis (30-80%) na detecção do câncer cervical e seus precursores, enquanto que a citologia líquida supera a convencional da detecção das neoplasias (APGAR; BROTZMAN; SPITZER, 2010). Um estudo que avaliou 431 pacientes encontrou que em 54% dos casos houve concordância entre o diagnóstico da citologia e histologia, tanto na normalidade quanto na graduação das lesões pré-malignas. Dos pacientes com citologia mostrando NIC, 90,8% tiveram confirmação pela histologia do colo do útero, enquanto 62,8% daqueles com citologia normal foram confirmados como tendo histologia normal (ANSCHAU; GUIMARÃES GONÇALVES, 2011).

O Sistema de Bethesda (The Bethesda System – TBS) analisa e classifica a amostra citológica, e está detalhada na tabela 1 a seguir.

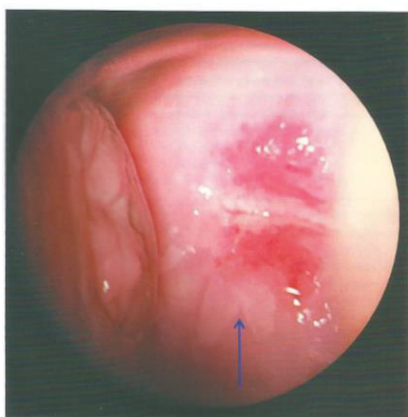
TABELA 1 - O SISTEMA DE BETHESDA

<p><u>ADEQUAÇÃO DA AMOSTRA</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Satisfatória para avaliação • Insatisfatório para avaliação <ul style="list-style-type: none"> ○ Amostra rejeitada/não processada ○ Amostra processada e avaliada, mas insatisfatória para avaliação de anormalidade epitelial
<p><u>CATEGORIAZAÇÃO GERAL</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Negativo para lesão intra-epitelial ou malignidade • Outras • Alteração celular epitelial
<p><u>INTERPRETAÇÃO/RESULTADO</u></p> <p><u>NEGATIVO PARA LESÃO INTRA-EPITELIAL OU MALIGNIDADE,</u></p> <p>- ORGANISMOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> * <i>Trichomonas vaginalis</i> * Organismos fúngicos morfológicamente consistentes com <i>Candida</i> spp. * Substituição na flora sugestiva de vaginose bacteriana * Bactérias morfológicamente consistentes com <i>Actinomyces</i> spp. * Alterações celulares consistentes com o vírus herpes simples <p>- <u>OUTROS ACHADOS NÃO-NEOPLÁSICOS:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> * Alterações celulares reativas associadas à <ul style="list-style-type: none"> - inflamação (incluindo reparo típico) - radiação - dispositivo intra-uterino (DIU) * Estado das células glandulares pós-histerectomia * Atrofia <p><u>OUTROS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Células endometriais (em mulher \geq 40 anos de idade)
<p><u>ALTERAÇÕES DAS CÉLULAS EPITELIAIS</u></p> <p><u>CÉLULAS ESCAMOSAS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Células escamosas atípicas <ul style="list-style-type: none"> ○ <u>De significado indeterminado</u> ○ <u>Não é possível excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau</u> • Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (abrangendo HPV/dislásia leve/NIC 1) • Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (abrangendo dislásia moderada e acentuada, CIS, NIC 2 e 3) com características suspeitas de invasão (se houver suspeita de invasão) • Carcinoma de células escamosas <p><u>CÉLULAS GLANDULARES</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Atípicas <ul style="list-style-type: none"> ○ Células endocervicais (sem outras especificações (SOE) ou especificar nos comentários) ○ Células endometriais (SOE ou especificar nos comentários) ○ Células glandulares (SOE ou especificar nos comentários) ○ Células endocervicais, possivelmente neoplásicas ○ Células glandulares, possivelmente neoplásicas • Adenocarcinoma endocervical in situ • Adenocarcinoma <ul style="list-style-type: none"> ○ Endocervical ○ Endometrial ○ Extra-uterino ○ Sem outras especificações (SOE) <p><u>OUTRAS NEOPLASIAS MALIGNAS (especificar)</u></p>

Já o exame de colposcopia consiste na avaliação ampliada do colo uterino através de um aparelho com lentes ópticas de magnificação chamado colposcópico. São aplicadas soluções de ácido acético e lugol para observar o comportamento do epitélio cervical a estes reagentes. O ácido acético coagula as proteínas das células, induzindo um branqueamento dos tecidos com carga proteica elevada. Por sua vez, o lugol, também conhecido como iodo forte, tem o efeito de corar de castanho escuro o glicogênio intracelular, presente em epitélios maduros. Como os epitélios patológicos ou displásicos têm alta carga de proteína devido sua densidade celular ativa e não são portadores de glicogênio por não amadurecerem, tornam-se acetobranco e iodo-negativos no exame colposcópico. Assim, o principal objetivo deste exame é localizar alterações e direcionar biópsias para áreas de maior suspeita.

Os achados deste exame são classificados em normais e anormais, e as figura 2 e 3 exemplificam os achados alterados à colposcopia. A nomenclatura colposcópica segue na tabela 2, baseada na Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (IFCPC), aceita no congresso mundial do Rio em 2011 (BORNSTEIN et al., 2012). A figura 4 exemplifica a classificação das Zonas de transformação.

FIGURA 2 – COLO UTERINO COM
ACHADOS MENORES



FONTE: ZANINE, 2020.
LEGENDA: EPITÉLIO
ACETOBranco TÊNUE

FIGURA 3 – COLO UTERINO COM
ACHADOS MAIORES



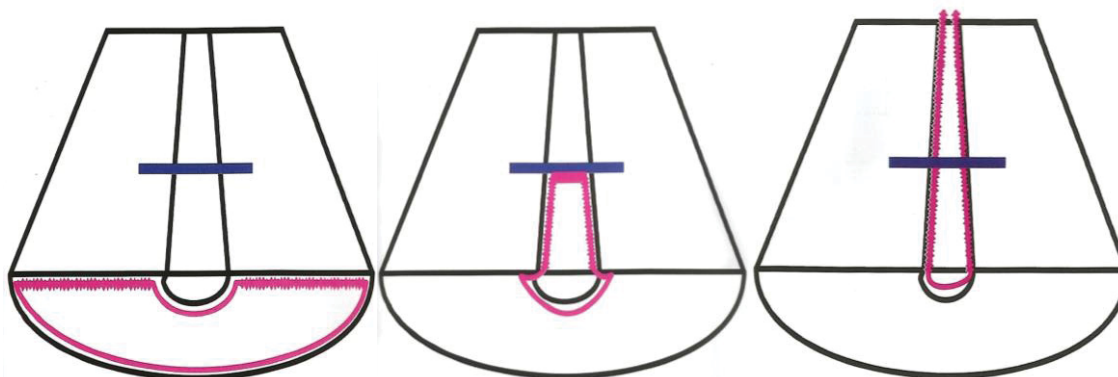
FONTE: ZANINE, 2020.
LEGENDA: MOSAICO IRREGULAR,
PONTILHADO GROSSEIRO E ORIFÍCIOS
GLANDULARES COM HALO BRANCO.

TABELA 2 - TERMINOLOGIA COLPOSCÓPICA DO COLO UTERINO IFCPC 2011

Avaliação geral	Colposcopia adequada ou inadequada (especificar o motivo sangramento, inflamação, cicatriz, etc) Visibilidade da junção escamocolunar: completamente visível, parcialmente visível e não visível Zona de transformação Tipo 1, 2 ou 3	
Achados colposcópicos normais	<p>Epitélio escamoso original</p> <ul style="list-style-type: none"> • Maduro • Atrófico <p>Epitéliocolunar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ectopia <p>Epitélio escamoso metaplásico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cistos de Naboth • Orifícios (glândulas) abertos <p>Decidua na gravidez</p>	
Achados colposcópicos anormais	Princípios gerais	Localização da lesão: Dentro ou fora da ZT e de acordo com a posição do relógio Tamanho da lesão: Número de quadrantes do colo uterino envolvidos pela lesão e tamanho da lesão em porcentagem do colouterino
	Grau (Menor)	1 Epitélio acetobranco tênue, de borda irregular ou geográfica
	Grau (Maior)	2 Epitélio acetobranco denso, acetobranqueamento de rápido aparecimento
	Não específico	Leucoplasia (queratose, hiperqueratose), erosão, captação da solução de lugol: positivo (corado) ou negativo (não corado) (teste de Schiller negativo ou positivo)
Suspeita de invasão	de	Vasos atípicos Sinais adicionais: vasos frágeis, superfície irregular, lesão exofítica, necrose, ulceração (necrótica), neoplasia tumoral/grosseira
Miscelânea		Zona de transformação congênita, condiloma, pólipos (ectocervical/endocervical), inflamação, estenose, anomalia congênita, sequel pós-tratamento, endometriose

FONTE: BORNSTEIN et al., 2012

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ZONAS DE TRANSFORMAÇÃO TIPOS 1, 2 E 3 RESPECTIVAMENTE



FONTE: ZANINE, 2020

De acordo com o grau do achado, associado à citologia oncótica, ao histórico da paciente e seus fatores de risco, é indicado o tratamento cirúrgico ou a conduta expectante. Se a citologia for de alto grau e os achados à colposcopia forem maiores, pode ser realizada a técnica “ver e tratar”, na qual a paciente é submetida ao tratamento na primeira consulta, sem necessidade de biópsia cervical prévia (APGAR; BROTZMAN; SPITZER, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2016).

Finalmente, a análise histopatológica confirma a hipótese levantada pela citologia e pela colposcopia, comprovando a presença de neoplasia no tecido epitelial cervical. O padrão ouro do diagnóstico histopatológico depende em grande parte se a anormalidade epitelial cervical foi amostrada pelo colposcopista. As células infectadas por HPV acumulam mutações, e sua aparência histológica torna-se bastante atípica. Quando a atipia basal se estende para o terço médio do epitélio escamoso cervical, há o diagnóstico de NIC 2; quando se estende para o terço superior do epitélio, há o diagnóstico de NIC 3, porém a membrana basal permanece intacta em todos os graus de NIC (APGAR; BROTZMAN; SPITZER, 2010). A taxa de discordância entre a citologia cervical e a histologia da biópsia é entre 11 e 28%, e quando isso ocorre, questiona-se se é um resultado falso positivo da citologia ou um resultado falso negativo da histologia. Esta situação pode advir de uma biópsia ser realizada em local diferente da lesão cervical, ou com técnica errônea, sem orientação por colposcopia ou com instrumentos inadequados. Outra possibilidade é quando houve um intervalo de tempo grande entre os dois exames: pode ter havido regressão das lesões que explicasse tal discrepância (ANSCHAU; GUIMARÃES GONÇALVES, 2011).

Entretanto, nas últimas décadas, vêm surgindo outras possibilidades de diagnóstico: ensaios de detecção de HPV através de diferentes técnicas, que são explicadas abaixo:

1. Teste de DNA do HPV. Essa modalidade é baseada na amplificação de sinal para detectar o DNA do vírus. Há várias opções de diferentes laboratórios fabricantes, que identificam de 2 até 14 tipos diferentes de HPV de alto risco. São os mais aplicados na prática clínica, principalmente como método primário de rastreamento do câncer do colo do útero em mulheres acima de 30 anos, por ser uma forma de rastreamento mais sensível que a citologia para lesões escamocelulares (94,6% vs 83,9%) (APGAR; BROTZMAN; SPITZER, 2010; MANLEY et al., 2016; TORNESELLO et al., 2013).

2. Teste de RNA do HPV. Estes tipos de testes são projetados para detectar mRNAs virais que codificam as proteínas E6 e E7, que são os fatores mais determinantes para o desenvolvimento de câncer cervical. Também conseguem detectar até 14 genótipos de HPV de alto risco (TORNESELLO et al., 2013).

3. Teste de proteínas do HPV. Esta categoria detecta os níveis de proteínas nos esfoliados das células cervicais, sendo capaz de identificar a proteína E6 codificada pelo HPV 16, 18 e 45 (TORNESELLO et al., 2013).

A principal vantagem do uso dos testes de HPV é a alta sensibilidade e o alto valor preditivo negativo. A ausência de HPV de alto risco indica uma probabilidade muito baixa de NIC 2-3 e maior proteção em comparação com a citologia, uma vez que o risco dessa alteração permanece bastante pequeno num intervalo de 5 anos após um teste negativo (TORNESELLO et al., 2013). O que preocupa é sua baixa especificidade, pois os testes não conseguem diferenciar infecções transitórias comuns de lesões pré-malignas. Quando o exame de HPV de alto risco é usado como principal método de triagem, as pacientes estão propensas a ter diagnósticos excessivos, tornando-se necessário um exame colposcópico adicional para confirmar o diagnóstico, aumentando o número de colposcopias desnecessárias e desperdício de recursos médicos (SUN et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

4.2.1 Marcadores

A citologia tem sensibilidade limitada para detectar precursores de câncer e muitas vezes a avaliação histológica é inconclusiva. Apesar de a análise das biópsias seguir muitos critérios, ainda sofre com a subjetividade inter-observador. Dessa forma, nas últimas décadas, tornou-se crucial o desenvolvimento de novos testes para melhorar essa triagem.

Relembrando o ciclo celular, as células se preparam para a replicação do DNA durante G1, replicam seu DNA na fase S, se preparam para a mitose em G2 e, finalmente, segregam os cromossomos filhos na fase M. Assim, várias proteínas reguladoras do ciclo celular são implicadas na patologia dos cânceres pelo papel central do ciclo celular na manutenção da integridade genômica. Numa grande parte das neoplasias malignas, as moléculas que inibem a passagem por estágios

específicos do ciclo celular são frequentemente encontradas como supressoras de tumor que são mutadas ou reprimidas (WOHLSCHEGEL et al., 2002).

Dessa forma, um biomarcador pode ser objetivamente medido como um indicador de processos patogênicos ou de uma resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Eles se tornaram ferramentas importantes para auxiliar os clínicos e patologistas quanto ao diagnóstico precoce, previsão da resposta à terapia e monitoramento de diversas doenças, inclusive das neoplasias intraepiteliais cervicais (DASARI; WUDAYAGIRI; VALLURU, 2015; SUN et al., 2018).

1. p16

O p16 é um biomarcador eficaz e tem sido amplamente utilizado para melhorar a reprodutibilidade das interpretações das lesões cervicais. Ele é superexpresso em infecções por HPVs oncogênicos, e o mecanismo pelo qual a mutação p16 desregula o ciclo celular está correlacionado ao aumento da expressão da oncoproteína E7, que determina a inativação de pRb, levando a um aumento do inibidor de quinase dependente de ciclina p16 (p16INK4a). O p16 melhora a precisão do diagnóstico, a confiabilidade e a qualidade na histopatologia, a fim de detectar com exatidão os precursores de câncer cervical (SUN et al., 2018; TORNESELLO et al., 2013). Uma limitação da análise de p16 como marcador de neoplasia cervical é que a expressão focal e ocasionalmente difusa também pode ser observada em células endocervicais benignas, na metaplasia tubária do endométrio e na endometriose cervical (SILVA et al., 2017). Outra limitação é sua menor especificidade, já que NIC 1 e NIC 2-3 às vezes mostram expressão semelhante de p16, e também porque pode ser encontrado em lesões inflamatórias do colo do útero (XING; WANG; WU, 2017).

2. Ki-67

O Ki-67 é um marcador de proliferação celular presente durante as fases ativas do ciclo celular (G1-S-G2-M), e um forte poder preditor de progressão nas lesões intraepiteliais precoces, pois regula a transcrição de RNA dos ribossomos (KUKU et al., 2015; SUN et al., 2018). Está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, síntese, G2 e mitose), mas está ausente nas células em repouso (G0), e não está envolvido especificamente no processo carcinogênico cervical (SILVA et al., 2017). Muitos estudos demonstraram ser um indicador

confiável da fração de crescimento de um tumor, haja vista que uma expressão aumentada de Ki-67 está correlacionada com um grau de NIC mais alto, além de ser altamente sensível para diferenciar NIC 1 e NIC 2-3 (TORNESELLO et al., 2013; XING; WANG; WU, 2017). Um estudo que aplicou Ki-67 em tecido cervical normal e nos diferentes graus de NIC encontrou aumento da expressão de Ki-67 em NIC 3 em comparação com casos de NIC 1 e 2. O Ki-67 foi expresso em todas as pacientes com NIC 2 e 3, e em 30% dos casos com NIC 1. Não houve diferença ao comparar o tecido normal com NIC 1 (MITILDZANS et al., 2017).

3. p53

Este é um gene supressor de tumor, que promove o reparo do DNA e/ou apoptose. Sua inativação está correlacionada com o desenvolvimento de vários cânceres humanos. Em seu estudo, Mitildzans observou a expressão de p53 em 71% dos casos de pacientes com NIC 3, que estava aumentada em comparação com pacientes NIC 1 e 2 (MITILDZANS et al., 2017). Entretanto, uma revisão sistemática concluiu que o p53 foi associado a lesões cervicais mais graves na minoria dos estudos (apenas quatro de nove estudos), sugerindo que este não é um bom biomarcador na avaliação das NICs (SILVA et al., 2017).

4. p63

É um homólogo precursor do gene supressor de tumor p53, cuja expressão se encontra no epitélio escamoso da mucosa ectocervical em maturação, na metaplasia escamosa e zona de transformação cervical. Um estudo detectou expressão do p63 em todos os pacientes avaliados com NIC 2 e NIC 3, e em apenas 30% dos casos de NIC 1. Porém esta expressão também foi aumentada na NIC 1 em comparação ao grupo controle (MITILDZANS et al., 2017).

5. Geminina

A geminina é um componente importante envolvido na progressão do ciclo celular, especificamente na progressão S-G2-M. Ela age como um regulador central do processo que inibe o início da replicação. Alterações na sua expressão estão associadas à proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular. Desta forma, desempenha um papel vital na fisiopatologia e desenvolvimento do câncer. A expressão de geminina está associada ao câncer de mama, carcinomas colorretais e

adenocarcinoma de pulmão de pequenas células (KUKU et al., 2015; XING; WANG; WU, 2017).

Um estudo aplicou geminina em diversos tecidos, e encontrou forte coloração nuclear nas populações de células em proliferação, como linfonodos reativos, criptas do intestino delgado, espermátocitos em desenvolvimento, camadas basais do epitélio da pele e do colo uterino. Em contraste, tecidos com proliferação celular mínima, como coração, córtex cerebral, rim e pulmão, não conseguiram corar para este marcador. Esse padrão sugeriu que a geminina é, de fato, expressa especificamente em células cíclicas. Assim, o autor levantou a hipótese de que, em vez de ser um inibidor do ciclo celular, a geminina está positivamente correlacionada com a proliferação celular, desempenhando um papel essencial nesta função (WOHLSCHEGEL et al., 2002).

Especificamente para patologias do colo do útero, há pouquíssimos trabalhos na literatura que estudaram a geminina. Um estudo investigou o papel deste marcador na predição da progressão das lesões precursoras cervicais. Foi encontrado que não houve expressão de geminina em epitélio cervical normal, porém a sensibilidade e especificidade na determinação da NIC 2-3 foram altas. Inclusive, a especificidade e a acurácia excederam a de biomarcadores como p16 e Ki-67. Assim, o estudo concluiu que a geminina tem um grande potencial como marcador de diagnóstico para identificar NIC 2-3 (XING; WANG; WU, 2017).

Um outro estudo recente avaliou o valor prognóstico da geminina associado à previsão da progressão de lesões de baixo grau. Lesões de NIC 1 apresentaram baixo nível de geminina, enquanto NIC 2-3 e CEC demonstraram uma expressão substancialmente mais alta. Altos níveis de geminina foram encontrados em 30,6% dos participantes com NIC 1, 80,6% dos participantes com NIC 2-3 e 93,3% dos pacientes com câncer cervical. O estudo concluiu que a geminina pode servir como um indicador prognóstico na progressão de NIC 1 (ZHENG et al., 2021).

4.3 TRATAMENTO

O tratamento para as NICs consiste basicamente em remover cirurgicamente a porção do colo do útero que contém a lesão intraepitelial. Os critérios para tratamento em pacientes com lesão de alto grau são: diagnóstico histológico de NIC 2-3 em biópsia e/ou curetagem de canal cervical; ou alto grau de

repetição em citologia (pelo menos 2 citologias com 6 meses de intervalo, após excluir lesão vaginal à colposcopia). Nos casos de NIC 1, os critérios são: persistência da lesão por pelo menos 2 anos; mais de 40 anos; e lesão de grande tamanho (envolvimento dos 4 quadrantes) ou extensão da lesão para o canal endocervical (colposcopia insatisfatória ou resultado positivo da curetagem de canal) (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2016).

A conização cervical, também conhecida como exérese da zona de transformação (EZT), pode ser realizada pelas técnicas com bisturi a frio, cirurgia de alta frequência com eletrodo em alça (CAF) e cirurgia de alta frequência com eletrodo reto (Straight Wire Excision of the Transformation Zone - SWETZ), e é o método cirúrgico excisional de escolha para diagnóstico e tratamento pois, além de permitir identificar os casos de invasão não detectados pela citologia e colposcopia, já serve como tratamento quando a lesão é intraepitelial (CARRIGG et al., 2013; KOC; SAHIN; AYAS, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2016). A técnica mais utilizada mundialmente é a CAF, por possuir várias vantagens: segurança, custo-benefício, possibilidade de avaliação histológica, realização com anestesia local em ambiente ambulatorial (RYU et al., 2010). A profundidade da remoção varia de acordo com o tipo de zona de transformação.

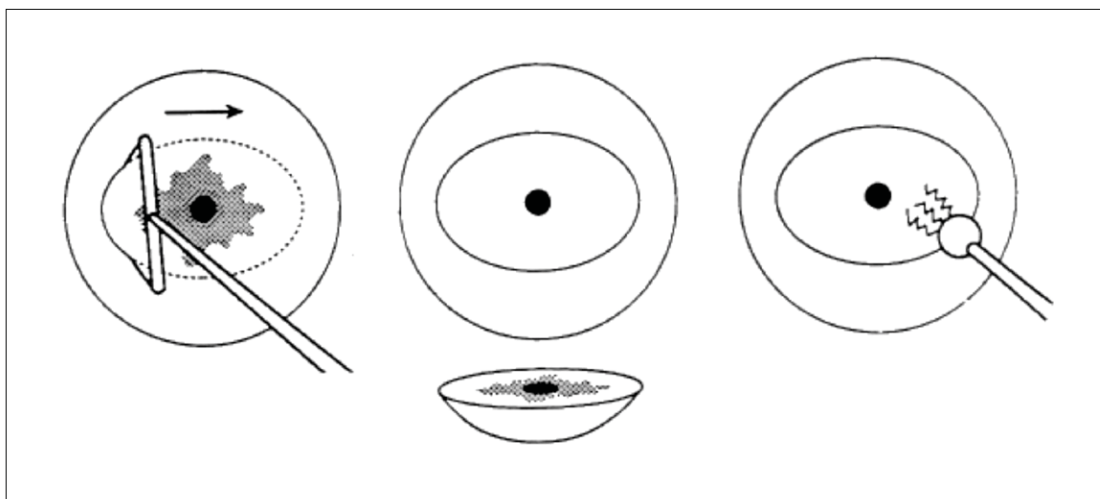
- Excisão do tipo 1: doença ectocervical ou que não se estende mais de 1 cm no canal endocervical.
- Excisão do tipo 2: doença que ocupa uma ZT do tipo 2 - necessário retirar maior porção do canal endocervical, o suficiente para ultrapassar a JEC, usualmente obtido com excisão de profundidade entre 1,5 e 2,0 cm.
- Excisão do tipo 3: Quanto a ZT é do tipo 3, é necessária maior profundidade de excisão – recomenda-se retirar entre 2 e 2,5 cm de (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2016).

Normalmente a excisão do tipo 1 e do tipo 2 é feita através de cirurgia de alta frequência, com a passagem de um eletrodo em alça semicircular sobre o colo, com posterior cauterização de pontos sangrantes. Já a excisão do tipo 3 costuma ser realizadas pela técnica de conização a frio, que retira uma peça cônica do colo uterino com bisturi a frio, seguida de hemostasia e cobertura do coto cervical com fios de absorção lenta (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2016). As figuras 5 e 6 demonstram a CAF e a conização por bisturi a frio, respectivamente. Idealmente deve-se realizar a EZT sob visão colposcópica, já que melhora a taxa de margens

negativas, minimiza a profundidade e volume do espécime excisado, melhora a acurácia do tratamento, e reduz os riscos do procedimento (MUNMANY et al., 2018).

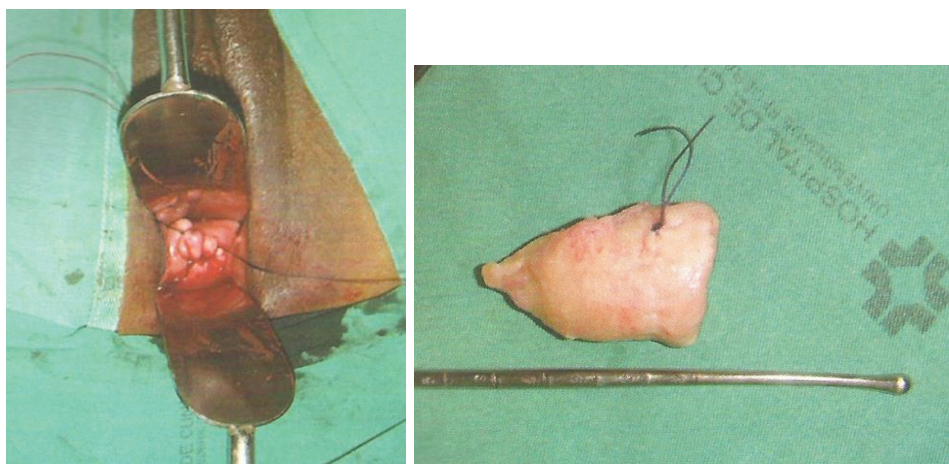
Embora seja um procedimento seguro, o sobretratamento com conização cervical pode colocar as mulheres em um risco desnecessário de complicações, como sangramento, infecção, estenose de canal endocervical, risco anestésico, além de ter um potencial impacto negativo nos resultados reprodutivos, especialmente para mulheres mais jovens, como incompetência istmo-cervical, abortos tardios, parto prematuro, ruptura prematura de membranas e baixo peso de nascimento (CARRIGG et al., 2013; HOWELLS et al., 2000; ZHANG et al., 2015).

FIGURA 5 – EZT POR CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA COM ELETRODO EM ALÇA (CAF).



FONTE: SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004

FIGURA 6 – EZT POR CONIZAÇÃO COM BISTURI A FRIO



FONTE: ZANINE, 2020

4.4 CONIZAÇÕES NEGATIVAS

Normalmente, a análise histopatológica das conizações confirma a existência da lesão intraepitelial de alto grau que havia sido diagnosticada previamente em citologia e/ou biópsias de colo uterino. Entretanto, algumas conizações podem apresentar resultado negativo, isto é, ausência de malignidade na amostra ou lesão de baixo grau (NIC 1), a depender dos critérios definidos por cada autor.

Uma revisão feita por Lorenset e Zanine em 2022 abordou as possíveis causas, consequências e implicações relacionadas às conizações negativas. Um resultado negativo traz frustração tanto para a paciente quanto para o médico, pois o significado clínico deste fenômeno ainda é indeterminado e pode gerar incerteza se o diagnóstico inicial estava correto, se a excisão não incluiu a lesão neoplásica visada e como estas pacientes devem ser manejadas, já que cones negativos podem induzir a erros no seguimento de pacientes com lesões cervicais pré-malignas (LORENSET; ZANINE, 2022).

O artigo analisou 19 artigos originais, cujo objetivo principal foi avaliar cones negativos. No Apêndice 1 consta a tabela retirada desta publicação, que discrimina os principais resultados de cada autor. Não se sabe exatamente o verdadeiro motivo pelo qual uma paciente com lesão de alto grau na citologia, histologia e/ou colposcopia ter um resultado de conização negativa, mas a revisão de Lorenset e Zanine aponta várias teorias:

- Translocação de células anormais de outros locais do trato genital inferior na coleta citológica (GOLBANG et al., 1997);
- Erros na colposcopia, superestimando as lesões de baixo grau como de alto grau (GOLBANG et al., 1997);
- Regressão espontânea da lesão no intervalo entre a coleta de citologia, biópsia cervical e a conização subsequente (RYU et al., 2010; THOMPSON et al., 2002; WALAVALKAR et al., 2016);
- Remoção completa de uma lesão focal e pequena no momento da biópsia cervical (MUNMANY et al., 2017; RYU et al., 2010; THOMPSON et al., 2002; WALAVALKAR et al., 2016);

- Avaliação errônea das amostras de pré-conização como lesão de alto grau (resultado falso positivo) (GOLBANG et al., 1997; THOMPSON et al., 2002; WALAVALKAR et al., 2016);
- Lesão de alto grau presente no bloco de tecido de parafina, mas não detectada na primeira análise patológica (resultado falso negativo) (GOLBANG et al., 1997; THOMPSON et al., 2002);
- Área com neoplasia não removida na conização, permanecendo no colo do útero (erro excisional) (RYU et al., 2010; WALAVALKAR et al., 2016).
- Desnudação ou distorção do epitélio da peça do cone em consequência de manuseio descuidado ou de artefato termal (GOLBANG et al., 1997; THOMPSON et al., 2002).

A revisão cita ainda alguns fatores de risco associados a uma maior probabilidade de ausência de lesão em uma amostra de cone: mulheres jovens, aumento da idade, menopausa, atrofia genital, paridade, uso de anticoncepcionais e tabagismo. Além disso, citologia negativa ou de baixo grau, NIC 2 confirmada por biópsia, longo intervalo entre biópsia e conização, tratamento prévio de HPV, teste de HPV negativo, baixa carga viral de HPV, ausência de HPV de alto risco e tipos virais diferentes de 16 ou 18 foram também relacionados aos cones negativos. Já para as características da colposcopia, os fatores de risco incluíram achados menores, lesões envolvendo menos de 1 quadrante do colo do útero, tamanho da lesão menor que 12mm^2 na medição colposcópica fotográfica, colposcopia insatisfatória, junção escamosa colunar não visível (zona de transformação tipo 3), e colposcopia normal no momento da conização em pacientes com lesão de alto grau (LORENSET; ZANINE, 2022).

Grandes limitações do artigo de Lorenset e Zanine são de que os estudos avaliados usaram combinações de NIC confirmada por biópsia e o método ver-e-tratar como indicação para a EZT, e nem todos os autores realizaram revisão histopatológica dos cones, constituindo uma amostra bastante heterogênea de casos e pacientes. Apenas dez estudos realizaram revisão do material com patologistas, e do total de 860 cones considerados inicialmente negativos, 684 cones foram confirmados como verdadeiramente negativos após análise de recortes profundos do espécime e/ou aplicação de biomarcadores. O uso da imunohistoquímica (IHQ) foi realizado em 7 estudos utilizando p16, sendo que dois deles

também utilizaram Ki-67. Após essa revisão patológica, a incidência de cones verdadeiramente negativos, em comparação aos cones inicialmente negativos, variou de 22,64% a 100%. Um total de 901 pacientes foram acompanhadas, e esse período de seguimento variou de 3 meses a 7 anos. A taxa de recorrência de pacientes com cone negativo variou de 1,16% a 30% (LORENSET; ZANINE, 2022).

Lorenset e Zanine identificaram vários fatores que parecem afetar os resultados e a credibilidade dos cones negativos, que serão abordados a seguir:

4.4.1 O papel da biópsia pré-cirúrgica

Moselhi *et al.* encontraram maior taxa de cones negativos quando os pacientes foram submetidos à biópsia pré-cirúrgica, enquanto Ryu *et al.* encontraram ausência de neoplasia em 17,7% das amostras de CAF com NIC 2-3 confirmada por biópsia. Houve maior chance de predizer ausência de lesão no espécime do cone na biópsia com NIC 2 em comparação com NIC 3 (MOSELHI *et al.*, 2002; RYU *et al.*, 2010). Koc *et al.* relataram um intervalo médio entre a biópsia cervical e a conização de 4 semanas e concluíram que a regressão da lesão neste curto período parecia improvável (KOC; SAHIN; AYAS, 2013). Para Zhang *et al.*, a prevalência de cone negativo aumentou de acordo com o intervalo de biópsia (ZHANG *et al.*, 2015). Além disso, um estudo espanhol reexaminou pacientes imediatamente antes da excisão e relatou que uma colposcopia normal aumentou o risco de cones negativos em 229 vezes (MUNMANY *et al.*, 2018).

4.4.2 Teste de HPV

Uma baixa carga de HPV, assim como tipos virais diferentes de 16/18 foram fortes preditores para cone negativo (MOSELHI *et al.*, 2002; RYU *et al.*, 2010). Um estudo encontrou que 75% dos pacientes com teste de HPV negativo tinham cones negativos (RODRIGUEZ-MANFREDI *et al.*, 2013)]. Manley *et al.* compararam duas coortes independentes de mulheres submetidas à conização antes e após a introdução do rastreamento do HPV. Cerca de 20% da coorte pré-HPV e 13,4% da coorte pós-HPV tiveram resultados negativos, demonstrando redução de 25% na incidência de cones negativos. No entanto, como a prevalência de falso positivos permanece alta e a especificidade do HPV para citologia de baixo grau é baixa, o

risco de tratar mulheres com infecção transitória pelo HPV pode aumentar. Por sua maior sensibilidade para triagem do que a citologia isolada, o teste de HPV ajuda a reduzir as taxas de cones negativos (MANLEY et al., 2016).

4.4.3 Revisão do material anatomopatológico

Um diagnóstico histopatológico errôneo pode ocorrer devido a atrofia, inflamação e metaplasia (GOLBANG et al., 1997). A revisão do espécime, embora nem sempre realizada, demonstrou grande importância para a confirmação de cones verdadeiramente negativos. Thompson *et al.* relataram uma taxa de cones falso negativos de 26% devido à má interpretação das lâminas originais ou descoberta de lesões em recortes profundos dos blocos de parafina (THOMPSON et al., 2002). Carrig *et al.* também constataram que 26% dos cones inicialmente negativos foram reclassificados como positivos após revisão e 28,3% tiveram o material pré-cirúrgico superestimado (CARRIGG et al., 2013). Para Golbang *et al.*, a reavaliação da citologia, colposcopia e principalmente do material histológico em novos recortes profundos revelou NIC inicialmente ausente em 21 dos 99 pacientes, questionando a falta de preocupação com resultados falso positivos (GOLBANG et al., 1997). Em outro estudo, 50% das amostras de citologia e 24% das biópsias pré-cirúrgicas foram superestimadas – um terço dos resultados negativos poderia ser atribuído ao sobrediagnóstico (WALAVALKAR et al., 2016). No estudo de Koc, 52% dos cones negativos foram devido à avaliação incorreta na primeira biópsia, diferindo da pesquisa de Witt, que também revisou as biópsias pré-cirúrgicas sem diagnósticos incorretos e detectou 24% de cones negativos em pacientes com biópsia de lesão de alto grau (KOC; SAHIN; AYAS, 2013; WITT et al., 2012).

4.4.4 Imuno-histoquímica

A análise de biópsias ainda sofre muito com a subjetividade interobservador. A análise IHQ é benéfica para o estudo de cones negativos, mas apenas 7 autores a realizaram. A proteína p16 ajuda a identificar e reclassificar a displasia oculta em biópsias de pacientes com HPV de alto risco. Um estudo que aplicou p16 nas áreas mais atípicas de cones considerados negativos após revisão anatomopatológica identificou displasia em 7 (13%) espécimes adicionais (CARRIGG et al., 2013).

Munmany *et al.* também aplicaram p16 às amostras negativas de CAF para identificar displasia oculta, e todas foram negativas (MUNMANY *et al.*, 2017, 2018). Um estudo chinês usou p16 apenas em pacientes com NIC 2, e os casos de coloração de alto escore foram menos propensos a ter um cone negativo em comparação com casos de baixo escore (ZHANG *et al.*, 2015). Outro estudo realizou p16 e Ki-67 e encontrou benefícios para espécimes com artefatos de electrocauterização (NAM *et al.*, 2015). A coloração Ki-67 e p16 é útil antes de fazer um diagnóstico definitivo, especialmente em situações de diagnóstico diferencial difícil (CARRIGG *et al.*, 2013; THOMPSON *et al.*, 2002).

4.4.5 Recorrência

Mulheres com cones negativos podem ter baixo risco de desenvolver anormalidades subsequentes (MOSELHI *et al.*, 2002). Walavalkar *et al.* encontraram taxas de recorrência mais baixas em mulheres com cones negativos em comparação com aquelas com cones positivos, independentemente do status da margem (WALAVALKAR *et al.*, 2016). Outro estudo detectou que 10% dos pacientes com cones negativos, apesar da lesão confirmada por biópsia, apresentavam anormalidade de alto grau durante o seguimento (WITT *et al.*, 2012). Em contraste, para Livasy *et al.*, a recorrência do cone negativo em pacientes com lesão de alto grau confirmada por biópsia foi maior do que a do cone positivo com margens livres (24% vs 15%) no seguimento de curto prazo (LIVASY; MOORE; VAN LE, 2004). Carrig *et al.* relataram que 30% dos pacientes com cones verdadeiramente negativos tiveram displasia ou carcinoma durante o seguimento, enfatizando a necessidade de vigilância cuidadosa (CARRIGG *et al.*, 2013). Para Rodriguez-Manfredi *et al.*, mulheres com cones negativos não tiveram menor risco de desenvolver NIC no seguimento, e para Munmany *et al.*, a recorrência foi menor para pacientes com lesões <12mm² e tipos de HPV diferentes de 16/18 (MUNMANY *et al.*, 2017; RODRIGUEZ-MANFREDI *et al.*, 2013).

4.4.6 Seguimento

Embora a ausência de displasia não seja um preditor de recorrência, também não garante ausência de doença durante o seguimento. Todas as pacientes

requerem vigilância rigorosa, independentemente dos achados da colposcopia, doença residual ou estratégia de tratamento. Deve-se realizar o mesmo seguimento de 2 anos recomendado para conizações positivas com margens comprometidas (KUROKI et al., 2016; MUNMANY et al., 2017, 2018; NAM et al., 2015; RYU et al., 2010; WITT et al., 2012).

4.4.7 Como evitar um cone negativo?

Pacientes com achados menores, pequenas lesões colposcópicas, teste de HPV negativo, baixa carga viral e tipos de HPV diferentes de 16/18 são mais propensas a ter cones negativos e não devem ser submetidas à excisão imediata. Uma reavaliação cuidadosa antes da conização deve ser realizada, pois pode ocorrer regressão da lesão (MUNMANY et al., 2018; RODRIGUEZ-MANFREDI et al., 2013; WEIGL et al., 2006). A coleta da citologia e realização de biópsia podem danificar o epitélio cervical. Assim, um intervalo de 4 a 6 semanas entre a avaliação e a conização é recomendado para o reparo epitelial. As distinções entre alterações degenerativas e regenerativas são mais difíceis de serem realizadas em intervalos menores (GOLBANG et al., 1997). No entanto, intervalos longos aumentam a probabilidade de cones negativos, pois muitos casos podem regredir espontaneamente em poucos meses (ZHANG et al., 2015). Para intervalos entre a citologia e a colposcopia superiores a 3 meses, a repetição da citologia pode reduzir o risco de iatrogenia, uma vez que 40% das biópsias com NIC 2 e 32% das biópsias com NIC 3 regridem (MANLEY et al., 2016). A medição do tamanho da lesão à colposcopia pode evitar cones desnecessários. Lesões <2,5 mm têm um risco 5 vezes maior de regressão do que as acima deste tamanho (MUNMANY et al., 2017). Para Munmany *et al.*, 82,3% das mulheres com colposcopia normal na CAF não apresentavam displasia, portanto, um exame normal prediz com precisão uma baixa probabilidade de lesão (MUNMANY et al., 2018). Além disso, aprimoramentos na avaliação patológica podem reduzir as taxas negativas de excisão. Vários estudos sugeriram que limitar os erros no diagnóstico citológico/histológico antes das conizações é o primeiro passo para reduzir procedimentos desnecessários (CARRIGG et al., 2013; WALAVALKAR et al., 2016; WEIGL et al., 2006). Além disso, recortes profundos nos blocos de parafina devem ser feitos rotineiramente em cones negativos (CARRIGG et al., 2013; GOLBANG et al., 1997; THOMPSON et al.,

2002). Nesses casos, o uso de p16, Ki-67 e genotipagem do HPV também é recomendado para identificar regiões displásicas ocultas (CARRIGG et al., 2013; MANLEY et al., 2016).

Como não existem atualmente *guidelines* ou diretrizes para rastreamento e tratamento de lesões pré-cancerosas que abordem especificamente o tópico dos cones negativos, após uma análise minuciosa sobre este assunto, Lorensen e Zanine recomendam:

- Intervalo de 4 a 6 semanas entre a biópsia e a excisão.
- Reavaliação em curto prazo para pacientes jovens com lesões colposcópicas pequenas e para e pacientes com colposcopia normal imediatamente antes da conização.
- Realizar recortes profundos rotineiramente no bloco de parafina.
- Aplicar marcadores de IHQ para identificar áreas displásicas ocultas.
- Teste de HPV de alto risco.
- A mesma abordagem de seguimento de 2 anos usada para cones positivos com margens comprometidas (LORENSEN; ZANINE, 2022).

4.5 PREVENÇÃO

Nos últimos anos, evidências claras apoiam o uso de testes baseados no HPV para o rastreamento de lesões precursoras do colo do útero. A integração efetiva de programas de triagem com testes baseados em HPV juntamente com campanhas de vacinas tem o potencial de praticamente eliminar a carga do câncer do colo do útero em todos os países do mundo neste século (BRAY et al., 2018).

O câncer de colo do útero é o resultado final de uma infecção viral e, como tal, a vacinação contra a infecção pelo HPV é uma estratégia disponível para sua prevenção primária (CASTELLSAGUÉ, 2008; HUH, 2009), que objetiva reduzir a longo prazo a incidência deste câncer, especialmente quando combinada a um estilo de vida sexual saudável e o uso adequado de contraceptivos (BRAY et al., 2018; WANG; HUANG; ZHANG, 2018).

Atualmente no mercado existem 3 tipos de vacina. A Gardasil® é uma vacina quadrivalente, cujo alvo são quatro sorotipos do HPV (6, 11, 16 e 18). A

Cervarix® é uma vacina bivalente que fornece proteção contra dois sorotipos de HPV (16 e 18). Recentemente foi lançada a vacina nonavalente, que ainda não está disponível no Brasil, e oferece cobertura a nove tipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58). Essas vacinas contêm partículas semelhantes a vírus, que geram fortes reações do sistema imunológico e produzem títulos de anticorpos muito maiores do que aqueles causados por infecção natural (WANG; HUANG; ZHANG, 2018).

Desta forma, a imunização em grande escala pode levar a intervalos mais longos entre exames de rastreio em mulheres que foram vacinadas, resultando em economia significativa de custos para programas de prevenção de câncer de colo de útero (WANG; HUANG; ZHANG, 2018).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo retrospectivo, observacional, transversal, realizado através de análise de dados de prontuário médico físico e eletrônico das pacientes que foram submetidas à conização de colo uterino e tiveram resultado negativo, assistidas e acompanhadas no serviço de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia (PTGIC) do Complexo Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), na cidade de Curitiba, no período de janeiro de 2010 até dezembro de 2020. Pela natureza retrospectiva da metodologia, não foi realizado cálculo amostral.

Para a realização deste trabalho foi feita, através de um banco de dados, a seleção de todas as pacientes que fizeram conização no período indicado para então restringir a amostra somente para os cones negativos. Todos os dados foram tabelados em uma planilha (Excel®) para análise estatística.

O trabalho foi devidamente cadastrado na Plataforma Brasil com Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) de número 43041221.8.0000.0096. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná sob parecer de número 4.571.045, disponível no Anexo 1.

5.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo pacientes que realizaram conização do colo uterino como primeiro tratamento para lesão de alto grau no período de 01 de janeiro de 2010 até 31 de dezembro de 2020, e que tiveram como resultado anatomopatológico a ausência de neoplasia ou a presença de neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC 1), já que esta última condição tem sabidamente um comportamento benigno, autolimitado, com altas taxas de regressão espontânea em curto período de tempo. Todas as técnicas cirúrgicas realizadas para a conização do colo uterino foram incluídas: bisturi a frio, cirurgia de alta frequência (CAF) com eletrodo em alça semicircular e cirurgia de alta frequência com eletrodo reto (SWETZ).

5.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do trabalho:

- a) Pacientes com resultado de cone com NIC 1 que foram submetidas ao procedimento por NIC 1 persistente ou condiloma de colo uterino;
- b) Pacientes com resultado de cone negativo que foram submetidas ao procedimento por patologias benignas, como fibromas ou pólipos;
- c) Pacientes cujo cone negativo foi realizado em outro serviço;
- d) Pacientes com histórico prévio de tratamento para neoplasia de alto grau;
- e) Pacientes que foram submetidas a histerectomia no seguimento.

5.2 OBTENÇÃO E DEFINIÇÃO DOS DADOS

As pacientes com cone negativo tiveram o prontuário físico e eletrônico revisado para confirmação dos dados inseridos no banco de dados, a fim de evitar possíveis erros na seleção da amostra. A avaliação das informações das pacientes se deu de acordo com as variáveis a seguir:

5.2.1 Dados demográficos e sociais

Essa categoria incluiu as variáveis: idade; paridade; tabagismo; sexarca; número de parceiros sexuais; método contraceptivo, histórico de IST (infecção sexualmente transmissível).

5.2.2 Tamanho colposcópico da lesão

Conforme a Terminologia Colposcópica do Colo Uterino de 2011 (IFCPC 2011), o tamanho da lesão é quantificado pelo número de quadrantes do colo uterino envolvidos pela lesão e tamanho da lesão em porcentagem do colo uterino. Para este estudo, o critério adotado foi o número de quadrantes.

5.2.3 Tipo de zona de transformação (ZT)

- a) ZT tipo 1: JEC ectocervical e completamente visível
- b) ZT tipo 2: JEC com componente endocervical, completamente visível
- c) ZT tipo 3: JEC com componente endocervical, não totalmente visível

5.2.4 Resultado de citologia oncótica inicial

- a) Negativo para malignidade
- b) Baixo grau: atipia de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS) e neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC 1)
- c) Alto grau: atipia de células escamosas, não podendo afastar lesão de alto grau (ASCH), atipia de células glandulares (AGC), neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC 2/3)

5.2.5 Achados à colposcopia:

- a) Sem achados: colposcopia sem alterações
- b) Achados menores: Epitélio acetobranco tênue, de borda irregular ou geográfica, mosaico fino, pontilhado fino.
- c) Achados maiores: Epitélio acetobranco denso, acetobranqueamento de aparecimento rápido, orifícios glandulares espessados, mosaico grosseiro, pontilhado grosseiro, margem demarcada, sinal da margem interna, sinal da crista.

5.2.6 Resultado anatomopatológico de biópsia inicial (quando realizada)

- a) Negativa para malignidade
- b) NIC 1: Neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau
- c) NIC 2/3: Neoplasia intraepitelial cervical de alto grau

5.2.7 Técnica cirúrgica utilizada

- a) Cone a frio
- b) CAF
- c) SWETZ

5.2.8 Tempo de seguimento, quantificado em dias

5.2.9 Recidiva da doença, definida como alteração de citologia (ASC-H, AGC, NIC 2-3) e/ou lesão de alto grau diagnosticada em histologia.

5.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por médicos residentes de Ginecologia e Obstetrícia do CHC-UFPR ou por médicos especializando do programa do Curso de Especialização em Tocoginecologia Avançada, sempre supervisionados por uma das médicas assistentes da equipe de PTGIC.

Para a realização dos cones a frio, a paciente era submetida a anestesia do tipo raquidiana. Após embrocação no canal vaginal com iodopovidona, com o auxílio de afastadores de Bresiky, o colo uterino era visualizado, e a área a ser excisada demarcada com lugol forte. Para diminuir o sangramento, as artérias paracervicais eram ligadas bilateralmente com fio de sutura. Então a conização do colo propriamente dita era realizada com bisturi a frio com lâmina de nº 11. Após a retirada da peça, a sutura de Stumdorf modificada era executada no lábio anterior e posterior. Se necessário, pontos adicionais eram feitos para hemostasia.

Já para a realização das CAFs, o colo do útero era exposto usando um espéculo adaptado para evacuação de fumaça. A área de anormalidade era delimitada com lugol forte. As pacientes que não estavam sob anestesia geral com sedação tinham de 0,5 a 1 mL de anestésico local injetado em cada quadrante do colo do útero usando seringa carpule. O tamanho da alça semicircular era selecionado de acordo com o tamanho da área a ser excisada, individualizada em cada caso. Em raras ocasiões em que uma lesão era muito grande para excisão em uma única passagem da alça, duas ou mais passagens sistemáticas eram realizadas. Após a retirada da peça, o leito cirúrgico era cuidadosamente inspecionado, com coagulação seletiva das áreas sangrantes por eletrodo do tipo bola, conforme necessidade. Em casos de hemostasia de difícil controle, também era aplicada solução de percloroeto férrico.

Finalmente, a técnica com eletrodo reto (SWETZ) era realizada de forma similar à da CAF, porém ao invés da passagem da alça semicircular, a conização do colo era feita com o eletrodo reto em angulação e profundidade semelhante à do cone a frio.

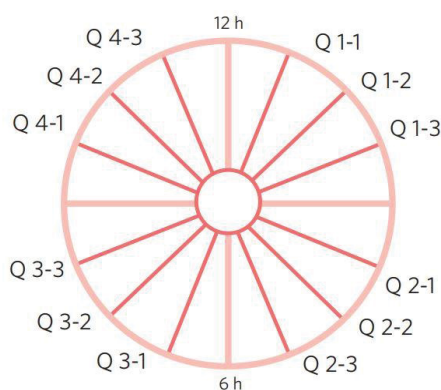
Independente da técnica cirúrgica utilizada, a peça excisada recebia marcação na posição de 12h com agulha ou fio de sutura, era conservada em formalina 10% e encaminhada para análise pelo Serviço de Patologia. Todas as pacientes eram orientadas a permanecer com tampão vaginal por aproximadamente 24h.

5.4 ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA

Rotineiramente, no laboratório de Anatomia Patológica do CHC-UFPR, as peças de conização são recebidas fixadas em formalina 10%. Após a análise dos aspectos macroscópicos que permitem orientar as margens endocervical e ectocervical, estas são pintadas com tinta nanquim de cores diferentes, a fim de orientar sua topografia na análise microscópica – etapa que ocorre após o processamento histológico completo do espécime.

O espécime é clivado com bisturi em duas partes no sentido de 12 horas até 6 horas, resultando em dois segmentos de colo, um deles compreendendo o primeiro e o segundo quadrante e o outro compreendendo o terceiro e o quarto quadrante. Na sequência essas duas partes serão clivadas nas topografias correspondentes a 3 horas e a 9 horas, separando o primeiro do segundo quadrante e o terceiro do quarto quadrante, respectivamente. Após isto, cada quadrante é submetido a cortes seriado paralelos no sentido anteroposterior em intervalos de 3 a 5 mm, até o canal cervical desaparecer completamente no corte, de tal forma que toda a mucosa (ectocérvice, endocérvice e junção escamo-colunar) seja representada, conforme a figura 7.

FIGURA 7 - RECORTE RADIAL DO CONE



FONTE: SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA

Se mais de uma passagem de alça for realizada, cada amostra é processada macroscopicamente de forma independente, de acordo com a marcação prévia para identificação dos quadrantes contemplados em cada amostra, de forma similar ao que já foi previamente descrito.

Há variação no número de cortes necessário para que cada peça possa ser totalmente incluída para análise histológica, uma vez que os cones apresentam variação de tamanho. Entretanto, em todos os casos é padronizada a total inclusão de cada cone, sem exceção alguma. A finalização do processamento macroscópico se dá através de acondicionamento sequencial de todas as fatias em cassetes, separando-as de acordo com seus respectivos quadrantes.

Após o processamento macroscópico, todo o material contido em cada cassete é submetido a desidratação com álcool e clarificação com xilol em processador automático de tecido para que possa ser incluído nos blocos de parafina e submetido à microtomia. A microtomia resulta em cortes histológicos com espessura entre 3 e 5 μm , que são acondicionados em lâminas retangulares de vidro (próprias para análise histológica). Cada lâmina então passa por desparafinização e é corada pelo método padrão de hematoxilina e eosina.

Por fim, após concluído o processamento histológico, cada lâmina é submetida à análise em microscópio óptico por um médico patologista certificado. Os diagnósticos emitidos são classificados de forma geral como negativos para neoplasia, neoplasia intraepitelial cervical grau 1 (NIC 1), neoplasia intraepitelial cervical grau 2 (NIC 2), neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC 3), carcinoma escamocelular microinvasor, carcinoma escamocelular invasor, adenocarcinoma in situ e adenocarcinoma invasor.

Esta classificação leva em consideração as características histológicas relativas a diferenciação, maturação e estratificação das células e suas anomalias nucleares, como núcleos aumentados, maior razão núcleo-citoplasma, hiperchromasia, polimorfismo nuclear. Quanto mais grave a NIC, maior o número de mitoses, que são pouco frequentes no epitélio normal, principalmente nas camadas superficiais do epitélio.

Segundo os critérios da International Agency for Research on Cancer (IARC), na NIC 1, as anomalias nucleares são mínimas e há poucas figuras de mitose, com limitação das células indiferenciadas ao terço inferior do epitélio. A NIC 2 apresenta alterações celulares displásicas, principalmente restritas à metade inferior ou aos

dois terços inferiores do epitélio, com anomalias nucleares mais acentuadas e figuras de mitose em toda a metade inferior do epitélio. Já na NIC 3, a diferenciação e a estratificação podem estar ausentes ou limitadas somente ao quarto superficial do epitélio, com numerosas figuras de mitose, muitas anormais, e anomalias nucleares que se estendem em toda a espessura do epitélio. Em todos os graus de neoplasia intraepitelial cervical não há extrusão de células basaloides no estroma cervical e a membrana basal permanece intacta (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

5.5 REVISÃO DOS ESPÉCIMES

Após a delimitação dos casos para estudo, uma patologista (A.P.P.) colaboradora da pesquisa, com larga experiência em patologia cervical, revisou as lâminas histológicas dos cones negativos. Não houve cegamento, ou seja, a patologista sabia que estava revisando lâminas com anatomopatológico sem displasia ou com NIC 1. Algumas pacientes haviam sido submetidas a biópsias cervicais pré-conização, e esse material também foi revisado a fim de confirmar o diagnóstico inicial que indicou a EZT. Nos casos em que o diagnóstico inicial e a revisão da patologista não foram unânimes, uma terceira patologista (S.H.O.M.) realizou a análise para definição de diagnóstico por consenso. Quando não houve consenso entre os 3 diagnósticos dos 3 patologistas, foi considerado como diagnóstico final aquele de maior gravidade.

Os blocos de parafina dos cones que ainda eram considerados negativos após a revisão foram submetidos a novos recortes, e esses níveis extras foram examinados buscando identificar lesões ocultas, não amostradas antes. Foi optado pela confecção de novas lâminas de histopatologia à confecção de *tissue microarray* para aumentar a sensibilidade do estudo e também para seguir a mesma metodologia adotada pelos artigos já publicados. Confirmando ausência de lesão de alto grau, três marcadores imuno-histoquímicos (p16, Ki-67 e geminina) foram utilizados nas lâminas histopatológicas para confirmar ausência de doença por HPV. A escolha destes marcadores se deu devido à associação do p16 e Ki-67 já ser muito utilizada na prática clínica na diferenciação de casos duvidosos na histopatologia cervical, e também dos poucos estudos publicados sobre o comportamento da geminina nas lesões precursoras do câncer de colo uterino.

O marcador p16 foi adquirido na empresa Biocare (anticorpo p16 INK4A - clone BC42). O marcador geminina foi adquirido na empresa Abcam (anticorpo Anti-Geminin 1A8). O marcador Ki-67 foi cedido pelo Hospital de Clínicas. Todos os processos de diluição e de coloração das lâminas seguiram as instruções dos respectivos fabricantes.

A classificação da imuno-histoquímica se deu da seguinte maneira:

- P16: positivo ou negativo
 - De acordo com a interpretação da imuno-histoquímica do p16 na neoplasia do trato anogenital inferior da Associação Britânica de Patologistas Ginecológicos, foi considerado como BLOCK positivo para p16 se a expressão anormal preencheu todos os requisitos: expressão nuclear forte e contínua em todas as células epiteliais nas camadas basal e parabasal com extensão ascendente; extensão para cima envolvendo pelo menos um terço inferior da espessura epitelial; e expressão anormal estendendo-se por pelo menos 6 células. A expressão fraca ou focal foi considerada negativa (SINGH et al., 2018).

- Ki-67: negativo ou intervalos de porcentagem referente ao número de células que tiveram coloração marrom-acastanhada (positiva) para o marcador:
 - $\leq 30\%$
 - 31-60%
 - $\geq 61\%$

- Geminina: negativo ou graduação em cruces referente à porcentagem de células que tiveram coloração marrom-acastanhada (positiva) para o marcador:
 - Negativo: 0 a 5%
 - 1+: 6-25%
 - 2+: 26 a 50%
 - 3+: >51%

5.6 GRUPO CONTROLE

Foram selecionadas 29 pacientes com diagnóstico de lesão intraepitelial de alto grau na peça da conização para compor o grupo controle. Para manter a qualidade do trabalho e refinar a análise estatística, estas pacientes também passaram pelas etapas da metodologia de revisão das lâminas e aplicação dos marcadores de imuno-histoquímica.

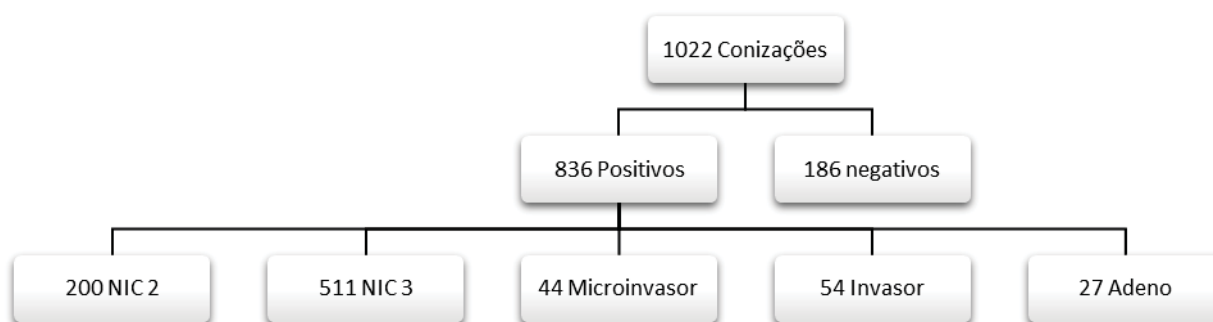
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, os dados foram descritos considerando para as variáveis quantitativas: a média, o desvio-padrão, mínimo, máximo, mediana e quartis. Para as variáveis qualitativas foram consideradas apenas as tabelas de frequência. Análises gráficas também foram realizadas para auxiliar na interpretação dos resultados (PEDRO LUIZ DE OLIVEIRA COSTA NETO, 2002). A associação do desfecho de pesquisa (Cone negativo ou positivo) com as variáveis qualitativas foi realizada pelos testes: Qui-quadrado de Pearson, Qui-quadrado ordinal ou Teste exato de Fisher. A comparação entre a variável explicativa qualitativa (Cone negativo ou positivo) e as variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de Mann-Whitney (AGRESTI, 2007). A verificação da normalidade das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk (ROYSTON, 1982). As análises foram executadas na linguagem computacional R, versão 4.1.2 (TEAM, 2021).

6 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

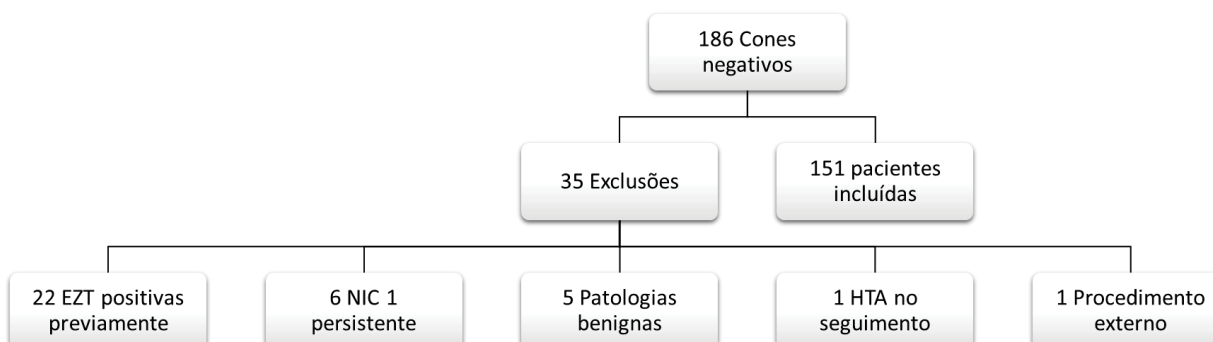
A análise do banco de dados do serviço de PTGIC do Complexo Hospital de Clínicas no período de 01 de janeiro de 2010 até 31 de dezembro de 2020 revelou que 1022 pacientes foram submetidas a conizações cervicais. Deste montante, 836 tiveram resultado positivo, com os seguintes achados: 200 com NIC 2, 511 com NIC 3, 44 com carcinoma microinvasor, 54 com carcinoma invasor, e 27 com adenocarcinoma, conforme consta na figura 8. Apenas 186 pacientes tiveram cones negativos, o que representa 18,19%.

FIGURA 8 - CONIZAÇÕES CERVICAIS



Os prontuários das 186 pacientes com cones negativos foram revisados minuciosamente. Conforme mostrado na figura 9, 35 pacientes foram excluídas do estudo: 22 tinham resultado de conização positiva previamente, 6 realizaram a conização por NIC 1 persistente ou condiloma cervical, 5 por patologia benigna (pólipo, fibroma), 1 paciente foi submetida a histerectomia total no seguimento, e 1 paciente não realizou o procedimento no serviço.

FIGURA 9 - EXCLUSÕES DO ESTUDO



Desta forma, 151 casos foram selecionados para o estudo. As lâminas das biópsias pré-procedimento (quando presentes) e das conizações foram recuperadas e analisadas pela patologista colaboradora da pesquisa.

6.1 DAS BIÓPSIAS PRÉ PROCEDIMENTO

83 pacientes foram submetidas à biópsia de colo uterino antes da conização, porém 19 eram externas, ou seja, foram realizadas e processadas fora do HC. Assim, conseguimos analisar 64 biópsias realizadas no nosso serviço. As lâminas histológicas foram analisadas por 2 patologistas e os casos que foram discordantes foram revisados por uma terceira patologista. Quando não houve consenso entre os 3 diagnósticos dos 3 patologistas, foi considerado como diagnóstico final aquele de maior gravidade.

41 pacientes mantiveram o diagnóstico após a revisão da segunda patologista, o que mostra uma concordância interobservador de 64,06%. As 23 pacientes restantes foram submetidas à análise da terceira patologista, e foi encontrado que:

- 14 tiveram 3 diagnósticos diferentes, prevalecendo o de maior gravidade;
- 4 mantiveram o diagnóstico inicial;
- 4 foram falso positivas (a primeira análise foi lesão de alto grau, e após a segunda e terceira revisão, foi rebaixado para NIC 1);
- 1 foi falso negativa (a primeira análise foi negativa, e após a segunda e terceira revisão foi reclassificada como lesão de alto grau).

6.2 DAS CONIZAÇÕES:

As 4 pacientes cuja biópsia teve resultado falso positivo foram excluídas do estudo. Assim, restaram 147 pacientes para análise de cones. Um total de 893 lâminas de conizações foram analisadas. Após a revisão da patologista, 100 diagnósticos foram concordantes com o inicial, considerando variações entre NIC 1 e negativo para malignidade. As lâminas das 47 pacientes restantes foram analisadas pela terceira patologista, que encontrou que:

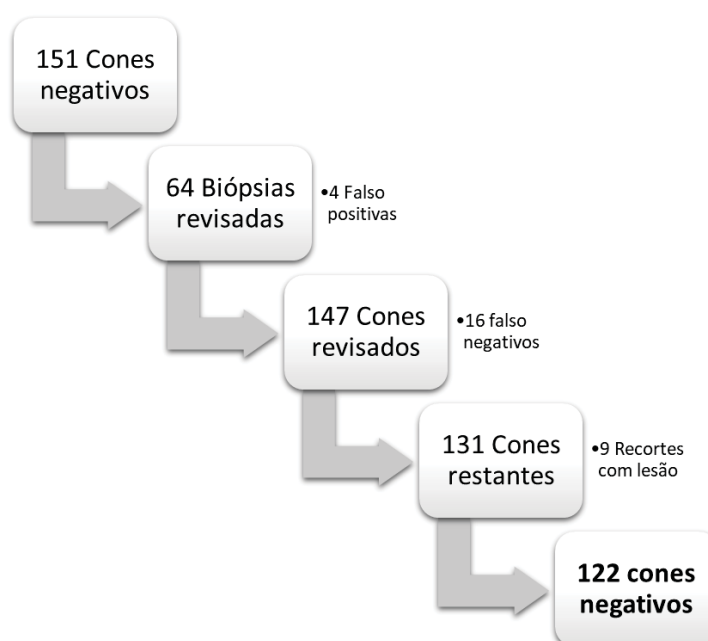
- 31 pacientes permaneceram como NIC 1/negativo;

- 13 tiveram 3 diagnósticos diferentes, prevalecendo o de maior gravidade, que foi alto grau;
- 3 tiveram o diagnóstico alterado para alto grau.

Dessa forma, 16 pacientes tiveram resultados falso negativos nas conizações: o primeiro diagnóstico foi negativo ou NIC 1 e, após a revisão do material, foi reclassificado para lesão de alto grau. Do total dos 147 cones, este montante representa 10,88% de falso negativos.

Em suma, após a revisão das biópsias e lâminas, reduzimos o número de cones negativos ou com NIC 1 de 151 para 131. Estas pacientes prosseguiram para o passo seguinte da metodologia: novos recortes dos blocos. Alguns destes cones já haviam sido submetidos a recortes profundos na primeira análise no serviço. Os que não haviam passado por esse processo foram então recortados exclusivamente para o estudo. Após a análise de mais 431 lâminas dos recortes, 9 pacientes foram excluídas do afunilamento por apresentarem lesões ocultas, não amostradas antes: 7 lesões de alto grau, 1 adenocarcinoma *in situ* e 1 CEC microinvasor. A figura 10 resume o afunilamento do estudo, restando 122 pacientes sem lesão histopatológica.

FIGURA 10 - AFUNILAMENTO DO ESTUDO



6.3 DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os marcadores p16, Ki-67 e geminina foram aplicados nas lâminas dos 122 cones negativos, e tiveram comportamentos variáveis, conforme descrito na tabela 3. Apesar de não apresentar nenhuma displasia cervical após a revisão das lâminas e dos novos recortes, 25 pacientes (20,49%) sem lesão histopatológica apresentaram p16 positivo. O Ki-67 teve positividade baixa ($\leq 30\%$) em 70,25%, positividade moderada (31-60%) em 24,79% e positividade alta ($\geq 61\%$) em apenas 4,96% das pacientes. A geminina foi negativa em apenas 5% dos casos, apresentou coloração de 1+ e 2+ em aproximadamente 25% cada, e 3+ em 45,83% das pacientes. Vale destacar que o Ki-67 e a geminina não foram reatores para 1 e 2 pacientes, respectivamente, mesmo com a realização de novas lâminas e nova imuno-histoquímica.

TABELA 3 - IHQ DOS CONES NEGATIVOS

IHQ	Classe	Nº	Freq.(%)
p16	Negativo	97	79,51
	Positivo	25	20,49
Ki-67 Não reator = 1	Positivo $\leq 30\%$	85	70,25
	Positivo 31-60%	30	24,79
	Positivo $\geq 61\%$	6	4,96
Geminina Não reator = 2	Negativo	6	5
	1+	30	25
	2+	29	24,17
	3+	55	45,83

Na tabela 4 aprofundamos a análise e discriminamos os cones negativos entre ausência de neoplasia e NIC 1, correlacionando com os resultados de imuno-histoquímica. Encontramos que os cones sem nenhum tipo de neoplasia apresentaram 89% de p16 negativo, 75% de Ki-67 $\leq 30\%$, e mais de 50% de geminina com expressão $\leq 2+$. Já os espécimes com NIC1 apresentaram maior prevalência de p16 positivo e Ki-67 com alta expressão, e geminina tendeu à maior positividade. Os marcadores p16 e Ki-67 apresentaram $p < 0,05$ e a geminina não demonstrou diferença estatística.

TABELA 4 – IHQ - COMPARAÇÃO ENTRE AUSÊNCIA DE NEOPLASIA X NIC 1

Variável	Classe	Ausência de neoplasia		NIC 1		P-valor
		Nº	Freq.(%)	Nº	Freq.(%)	
p16*	Negativo	89	89,00	8	38,10	<u><0,001</u>
	Positivo	11	11,00	13	61,90	
Ki-67** Não reator = 1	Positivo ≤30%	75	75,00	10	50,00	<u>0,023</u>
	Positivo 31-60%	22	22,00	7	35,00	
	Positivo ≥ 61%	3	3,00	3	15,00	
Geminina** Não reator = 2	Negativo	6	6,12	0	0	0,517
	1+	24	24,49	6	28,57	
	2+	22	22,45	7	33,33	
	3+	46	46,94	8	38,1	

Teste Exato de Fisher (Nível de significância de 5%)

* Teste de Qui-quadrado (Nível de significância de 5%)

** Teste de Qui-quadrado Ordinal - Cochran - Armitage (Nível de significância de 5%)

6.4 DOS 122 CONES NEGATIVOS

Após a revisão histopatológica e exclusão dos resultados errôneos, a taxa dos cones negativos foi reduzida para 11,93% (122/1022) em nosso serviço. As tabelas 5 e 6 descrevem as características das 122 pacientes cujos cones não apresentaram lesão histológica após todas as etapas da metodologia.

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES COM CONES NEGATIVOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS)

Variável	Média (DP)	Mediana [IIQ]	Mín. - Máx.
Idade na primeira consulta	36,93 (10,36)	36 [28 - 44]	18 - 65
Menarca	12,98 (1,7)	13 [12 - 14]	9 - 19
Sexarca	16,52 (2,58)	16 [15 - 18]	11 - 25
Gestações	2,3 (1,88)	2 [1 - 3]	0 - 10

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES COM CONES NEGATIVOS (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS)

Variável	Classe	Nº	Freq.(%)
Método contraceptivo	Hormonal	66	54,55
	Não hormonal	29	23,97
	Nenhum	26	21,49
Nº de Parceiros	1 - 3	43	48,86
	4 - 5	23	26,14
	6 - 9	8	9,09
	> 10	14	15,91
Histórico de IST	Clamídia	1	0,87
	Hepatite C	1	0,87
	Herpes genital	2	1,74
	HIV	5	4,35
	HPV	2	1,74
	Nega	103	89,57
Tabagismo	Sífilis e Hepatite C	1	0,87
	Nega	79	66,39
Citologia que indicou procedimento	Sim	40	33,61
	Sem informação	5	4,1
	Negativo para malignidade	11	9,02
	Baixo grau	35	28,69
Tipo de Zona de Transformação	Alto grau	71	58,2
	ZT1	93	76,23
	ZT2	7	5,74
Achados à colposcopia	ZT3	22	18,03
	Sem achados	10	8,2
	Achados menores	23	18,85
Classificação da lesão na colposcopia	Achados maiores	89	72,95
	Sem lesões	10	8,2
	1 quadrante	38	31,15
	2 quadrantes	44	36,07
	3 quadrantes	13	10,66
Ver e tratar	4 quadrantes	17	13,93
	Não	64	52,46
Técnica	Sim	58	47,54
	CAF	90	73,77
	Conização com bisturi a frio	31	25,41
	SWETZ	1	0,82

A descrição do perfil das pacientes é com mediana de 36 anos, menarca aos 13 anos, início da atividade sexual aos 16 anos, com 2 gestações. A maioria das pacientes (54,55%) utilizava método hormonal para contracepção e teve de 1-3 parceiros sexuais (48,86%) até o momento da realização do procedimento cirúrgico.

Apenas 12 (10,43%) pacientes tinham histórico de infecções sexualmente transmissíveis, como clamídia, sífilis, HIV, HPV, herpes e hepatite C. A maioria (66,39%) não tinha histórico de tabagismo. Em relação à indicação do procedimento, a maioria tinha citologia alterada com alto grau (58,2%), com ZT do tipo 1 (76,23%), e achados maiores à colposcopia (72,95%), acometendo 2 quadrantes do colo uterino (36,07%).

Sessenta e quatro (52,46%) pacientes foram submetidas à biópsia cervical antes da conização. A mediana do intervalo entre a biópsia e a conização foi de 122 [93 - 172,5] dias. Já o intervalo de tempo para todas as pacientes entre a indicação e a realização do procedimento cirúrgico propriamente dito foi de 71 [34,25 - 126,5] dias, independentemente de a indicação ter sido por biópsia ou ver e tratar. A técnica mais utilizada foi a CAF (73,77%), seguida da conização com bisturi a frio (25,41%) e apenas um caso de SWETZ.

6.4.1 . Seguimento e recidiva

O seguimento foi realizado através de consultas ambulatoriais nas quais eram coletadas citologias e realizadas colposcopias. O tempo mediano de seguimento das 122 pacientes com cone negativo foi de 448 [373 - 797,5] dias. Discriminamos este resultado conforme o desfecho: 66 (54,1%) pacientes receberam alta ambulatorial após realizar o *follow-up*, que variou de 172 a 2612 dias (mediana de 523 dias), com realização de até 9 citologias/colposcopias (mediana de 2 exames). Cinquenta e uma (41,8%) pacientes perderam o seguimento, com medianas de 338 dias de *follow-up* e de 1 exame citológico/colposcopia, ressaltando-se que muitas nem chegaram a fazer o primeiro acompanhamento em 6 meses. Até o momento da coleta dos dados, 5 pacientes ainda permaneciam em seguimento no ambulatório de PTGIC.

Do total dos cones negativos, 23 pacientes tiveram alterações na citologia durante o *follow-up*, considerando qualquer tipo de resultado anormal. Apenas 10 (8,19%) apresentaram recidiva durante o acompanhamento, considerando alterações maiores em citologia ou histologia (ASCH, AGC, alto grau). O tempo entre a realização da conização e a recidiva variou de 181 a 1759 dias, com mediana de 432 [IIQ 264,75 - 600,25] dias. Destas 10 pacientes, 4 foram submetidas a nova conização cervical. Conforme detalhado nas tabelas 7 e 8, as pacientes estavam em

idade perimenopausa, com mediana de 2 gestações, sendo que a maioria não usava nenhum tipo de método contraceptivo, ou usava método hormonal. Mais da metade das pacientes com recidiva (66,67%) teve de 1 a 3 parceiros sexuais, não tinha histórico de tabagismo (70%) nem de infecções sexualmente transmissíveis (100%). Para a maioria das pacientes, a citologia que indicou o procedimento era de alto grau (50%), e a colposcopia tinha ZT do tipo 1 (80%) com achados maiores (60%) em pelo menos 1 quadrante do colo uterino (40%). Setenta por cento tiveram a indicação por ver e tratar e realizaram CAF. Em relação à imuno-histoquímica, a maioria (80%) apresentou p16 negativo, Ki-67 com positividade baixa ($\leq 30\%$ em 70% dos casos) e geminina com gradação de 3+ em 44,44%. Entretanto, todos os dados apresentados não tiveram significância estatística.

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES COM RECIDIVA (VARIÁVEIS CONTÍNUAS)

Variável (Nº)	Média (DP)	Mediana [IIQ]	Mín. - Máx.	P-valor
Idade 1ª consulta	42,3 (12,84)	47 [29 - 50,5]	29-50,5	0,099
Gestações	2,4 (2,07)	2 [1,25 - 3]	1,25-3	0,654
Menarca	12,2 (1,14)	13 [11,25 - 13]	11,25-13	0,109
Sexarca	18,83 (5,12)	18 [17,25 - 22,5]	17,25-22,5	0,070
Tempo até recidiva (dias)	572 (477,11)	432 [264,75 - 600,25]	181 - 1759	-

TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES COM RECIDIVA (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS)

(continua)

Variável	Classe	Sem recidiva		Com recidiva		P-valor
		Nº	Freq.(%)	Nº	Freq.(%)	
Método contraceptivo	Hormonal	62	55,86	4	40,00	0,360
	Não hormonal	27	24,32	2	20,00	
	Nenhum	22	19,82	4	40,00	
Nº de Parceiros	1 - 3	39	47,56	4	66,67	0,919
	4 - 5	22	26,83	1	16,67	
	6 - 9	8	9,76	0	0,00	
	> 10	13	15,85	1	16,67	
Histórico de IST	Não	94	88,68	9	100,00	0,618
	Sim	12	11,32	0	0,00	
Tabagismo*	Nega	72	66,06	7	70,00	0,999
	Sim	37	33,94	3	30,00	

TABELA 8 – CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES COM RECIDIVA (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS)
(conclusão)

Citologia que indicou procedimento	Sem informação	3	2,68	2	20,00	0,125
	Negativo para malignidade	11	9,82	0	0,00	
	Baixo grau	32	28,57	3	30,00	
	Alto grau	66	58,93	5	50,00	
Tipo de Zona de Transformação	ZT1	85	75,89	8	80,00	0,676
	ZT2	6	5,36	1	10,00	
	ZT3	21	18,75	1	10,00	
Achados à colposcopia	Sem achados	10	8,93	0	0,00	0,211
	Achados menores	19	16,96	4	40,00	
	Achados maiores	83	74,11	6	60,00	
Classificação da lesão na colposcopia	Sem lesões	10	8,93	0	0,00	0,906
	1 quadrante	34	30,36	4	40,00	
	2 quadrantes	41	36,61	3	30,00	
	3 quadrantes	12	10,71	1	10,00	
	4 quadrantes	15	13,39	2	20,00	
Ver e tratar*	Não	61	54,46	3	30,00	0,249
	Sim	51	45,54	7	70,00	
Técnica	CAF	83	74,11	7	70,00	0,738
	Conização com bisturi a frio	28	25,00	3	30,00	
	SWETZ	1	0,89	0	0,00	
p16*	Negativo	89	79,46	8	80,00	0,999
	Positivo	23	20,54	2	20,00	
Ki-67 Não reator = 1	Positivo ≤30%	78	70,27	70	7,00	0,835
	Positivo 31-60%	27	24,32	30	3,00	
	Positivo ≥ 61%	6	5,41	0	0,00	
Geminina Não reator = 2	Negativo	6	5,41	0	0,00	0,941
	1+	27	24,32	3	33,33	
	2+	27	24,32	2	22,22	
	3+	51	45,95	4	44,44	

Teste Exato de Fisher (Nível de significância de 5%)

* Teste de Qui-quadrado (Nível de significância de 5%)

As outras 13 pacientes que apresentaram alterações citológicas como ASCUS e NIC 1 no período de seguimento não foram consideradas como recidiva da doença.

6.5 COMPARAÇÃO ENTRE CONES NEGATIVOS E GRUPO CONTROLE

Ao compararmos as 122 pacientes com cone negativo com as 29 pacientes com controles positivos, conforme descrito nas tabelas 9 e 10, encontramos que a

mediana da menarca e da sexarca foi a mesma. Ambos os grupos, em sua maioria, tinham método contraceptivo hormonal, de 1-3 e 4-5 parceiros sexuais, e não possuíam histórico de tabagismo. Também para ambos os grupos, em sua maioria, a citologia que indicou a conização foi alto grau, o tipo de ZT foi do tipo 1, a colposcopia continha achados maiores, ocupando 2 quadrantes cervicais, com realização de biópsia cervical pré procedimento, e a técnica mais utilizada foi CAF. No entanto, todas essas variáveis não apresentaram significância estatística.

As variáveis que tiveram o p-valor <0,05 foram apenas a idade (mediana de 36 para cones negativos e de 31 para controles positivos – p=0,014) e o número de gestações (mediana de 2 para cones negativos e 1 para controles positivos – p=0,029). Assim, pacientes mais velhas e com histórico de mais gestações tiveram maior probabilidade de terem um cone negativo.

Quando analisamos especificamente a IHQ, encontramos que, em comparação com os cones negativos, os controles positivos apresentaram maiores índices de p16 positivo (21/29 = 72,41%), maior positividade intermediária (31 - 60%) e alta ($\geq 61\%$) para Ki-67 (21/29 = 72,42%), e mais reatividade para geminina, com nenhum caso negativo e 68,97% (20/29) com gradação de 3+. Toda a análise da IHQ apresentou significância estatística, com p<0,05. As figuras 10, 11 e 12 demonstram as expressões histopatológicas dos marcadores nos diferentes tipos de epitélio cervical, com variações entre negativo para malignidade, NIC 1 e NIC 2-3.

TABELA 9 - COMPARAÇÃO DE CONES NEGATIVOS VS. CONTROLES (VARIÁVEIS CONTÍNUAS)

Variável (Nº)	Classe (Nº)	Média (DP)	Mediana [IIQ]	Mín. - Máx.	P-valor
Idade 1º consulta	Cone negativo (122)	36,93 (10,36)	36 [28 - 44]	18 - 65	<u>0,014</u>
	Controle positivo (29)	31,9 (9,55)	31 [26 - 36]	14 - 56	
Menarca	Cone negativo (117)	12,98 (1,7)	13 [12 - 14]	9 - 19	0,346
	Controle positivo (27)	13,22 (1,4)	13 [12,5 - 14,5]	10 - 15	
Sexarca	Cone negativo (90)	16,52 (2,58)	16 [15 - 18]	11 - 25	0,753
	Controle positivo (19)	16,11 (1,76)	16 [15,5 - 17]	12 - 20	
Gestações	Cone negativo (122)	2,3 (1,88)	2 [1 - 3]	0 - 10	<u>0,029</u>
	Controle positivo (29)	1,48 (1,09)	1 [1 - 2]	0 - 4	

Nota: Teste de Mann-Whitney (nível de significância de 5%)

IIQ: Intervalo interquartil (1º e 3º quartil).

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DE CONES NEGATIVOS VS. CONTROLES (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS)

(continua)

Variável	Classe	Cones negativos		Controles positivos		P-valor
		Nº	Freq.(%)	Nº	Freq.(%)	
Método contraceptivo	Hormonal	66	54,55	17	60,71	0,835
	Não hormonal	29	23,97	6	21,43	
	Nenhum	26	21,49	5	17,86	
Nº de Parceiros	1 - 3	43	48,86	7	38,89	0,394
	4 - 5	23	26,14	7	38,89	
	6 - 9	8	9,09	0	0	
	> 10	14	15,91	4	22,22	
Histórico de IST	Clamídia	1	0,87	0	0	0,542
	Hepatite C	1	0,87	0	0	
	Herpes genital	2	1,74	0	0	
	HIV	5	4,35	0	0	
	HPV	2	1,74	0	0	
	Nega	103	89,57	24	96	
	Sífilis	0	0	1	4	
Sífilis e Hepatite C	1	0,87	0	0		
Tabagismo	Nega	79	66,39	18	62,07	0,825
	Sim	40	33,61	11	37,93	
Citologia que indicou o procedimento	Sem informação	5	4,1	1	3,45	0,130
	Negativo para malignidade	11	9,02	0	0	
	Baixo grau	35	28,69	8	27,59	
	Alto grau	71	58,2	20	68,97	
Tipo de Zona de Transformação	ZT1	93	76,23	21	72,41	0,689
	ZT2	7	5,74	2	6,9	
	ZT3	22	18,03	6	20,69	
Achados à colposcopia	Sem achados	10	8,2	0	0	0,078
	Achados menores	23	18,85	4	13,79	
	Achados maiores	89	72,95	25	86,21	
Classificação da colposcopia	Sem lesões	10	8,2	0	0	0,162
	1 quadrante	38	31,15	7	24,14	
	2 quadrantes	44	36,07	11	37,93	
	3 quadrantes	13	10,66	2	6,9	
	4 quadrantes	17	13,93	9	31,03	
Ver e tratar*	Não	64	52,46	17	58,62	0,696
	Sim	58	47,54	12	41,38	
Técnica	CAF	90	73,77	23	79,31	0,283
	Conização com bisturi a frio	31	25,41	5	17,24	
	SWETZ	1	0,82	1	3,45	
p16*	Negativo	97	79,51	8	27,59	<u><0,001</u>
	Positivo	25	20,49	21	72,41	
Ki-67** Não reator = 1	Positivo ≤30%	85	70,25	8	27,59	<u><0,001</u>
	Positivo 31-60%	30	24,79	14	48,28	
	Positivo ≥ 61%	6	4,96	7	24,14	

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DE CONES NEGATIVOS VS. CONTROLES (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS)

(conclusão)

	Negativo	6	5,00	0	0	
Geminina**	1+	30	25,00	5	17,24	<u>0,033</u>
Não reator = 2	2+	29	24,17	4	13,79	
	3+	55	45,83	20	68,97	

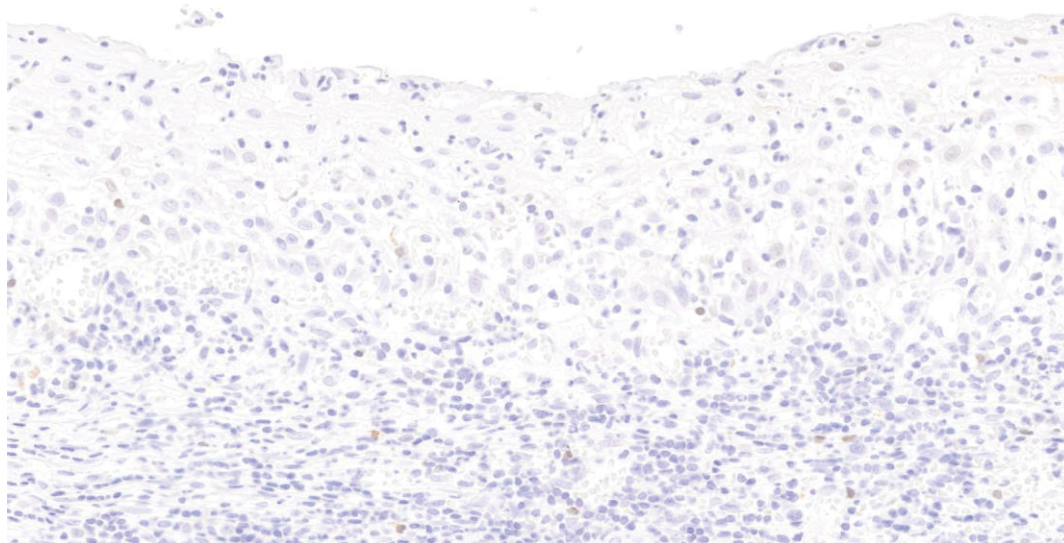
Teste Exato de Fisher (Nível de significância de 5%)

* Teste de Qui-quadrado (Nível de significância de 5%)

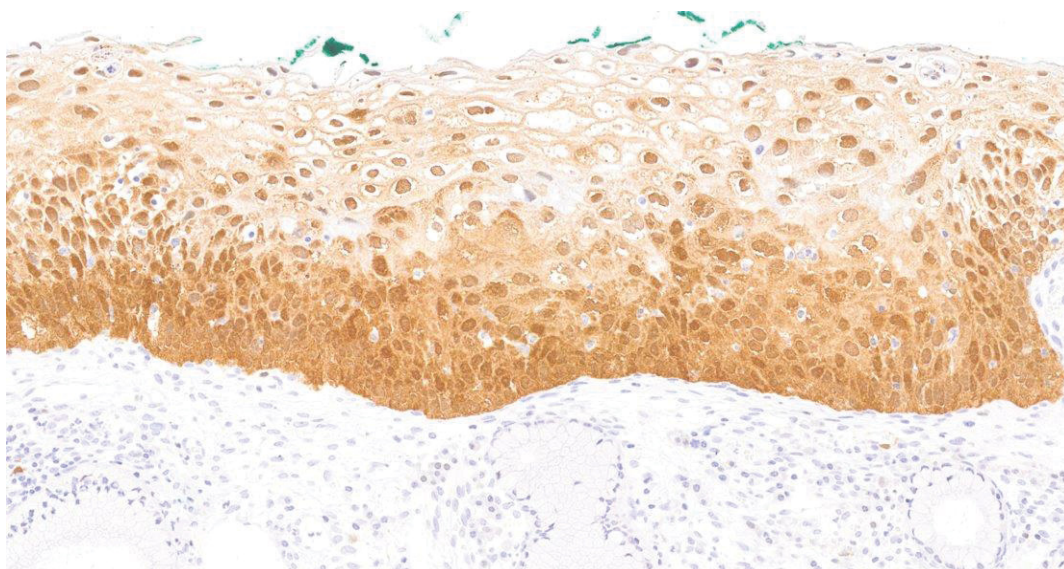
** Teste de Qui-quadrado Ordinal - Cochran - Armitage (Nível de significância de 5%)

FIGURA 11 - EXPRESSÃO DO P16

Negativo



NIC 1



NIC 2-3

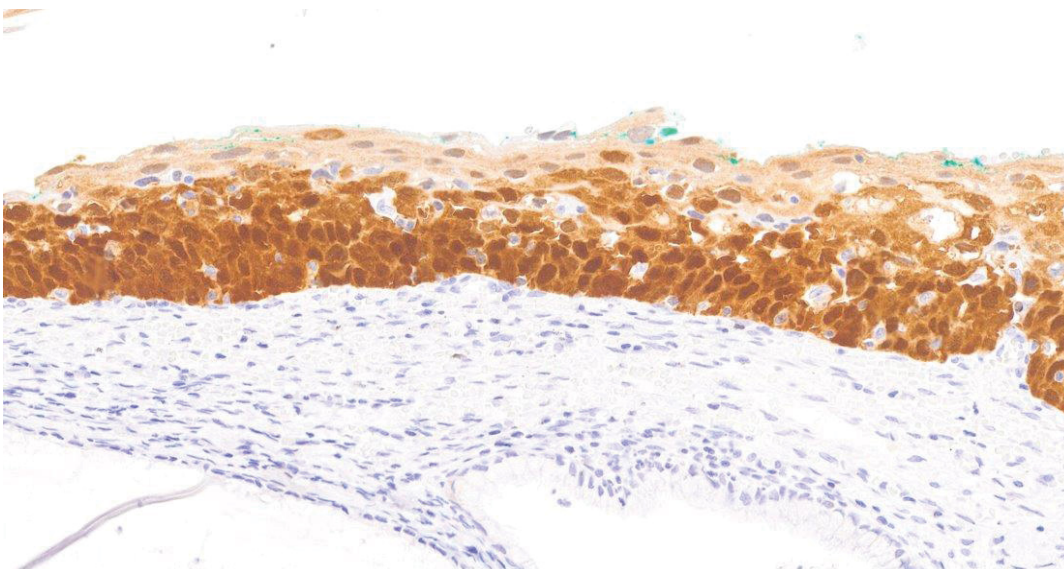
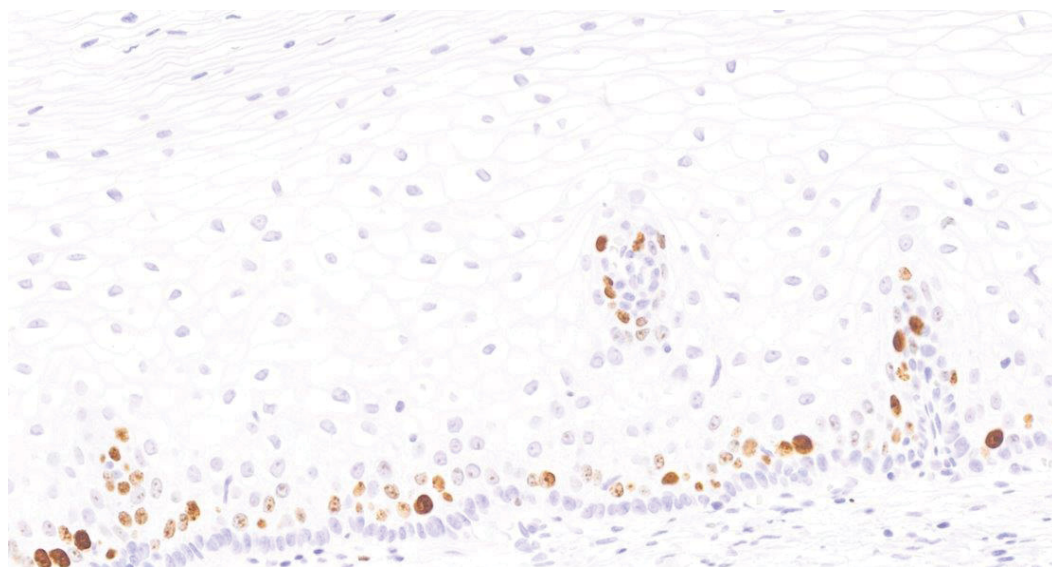
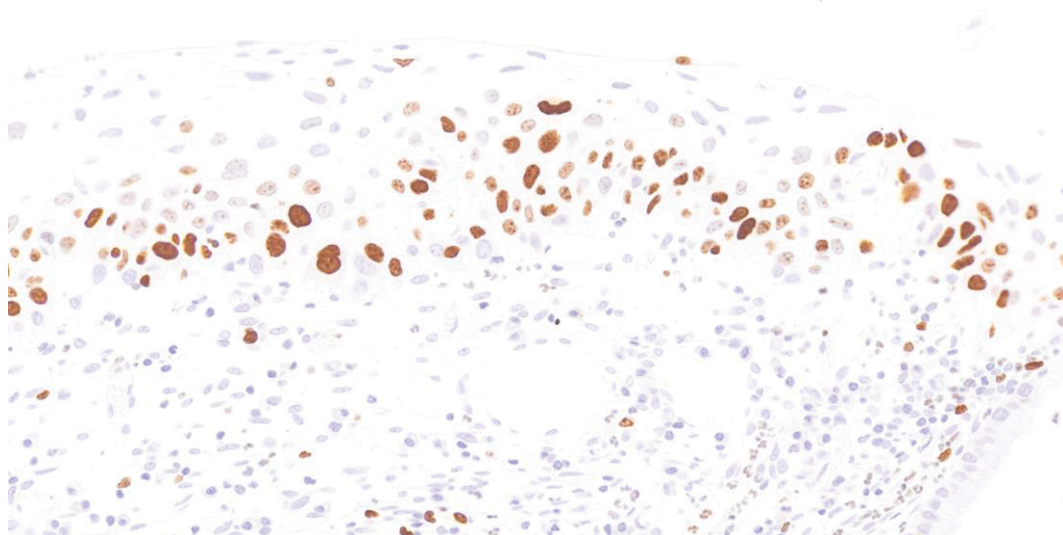


FIGURA 12 - EXPRESSÃO DO KI-67

Negativo



NIC 1



NIC 2-3

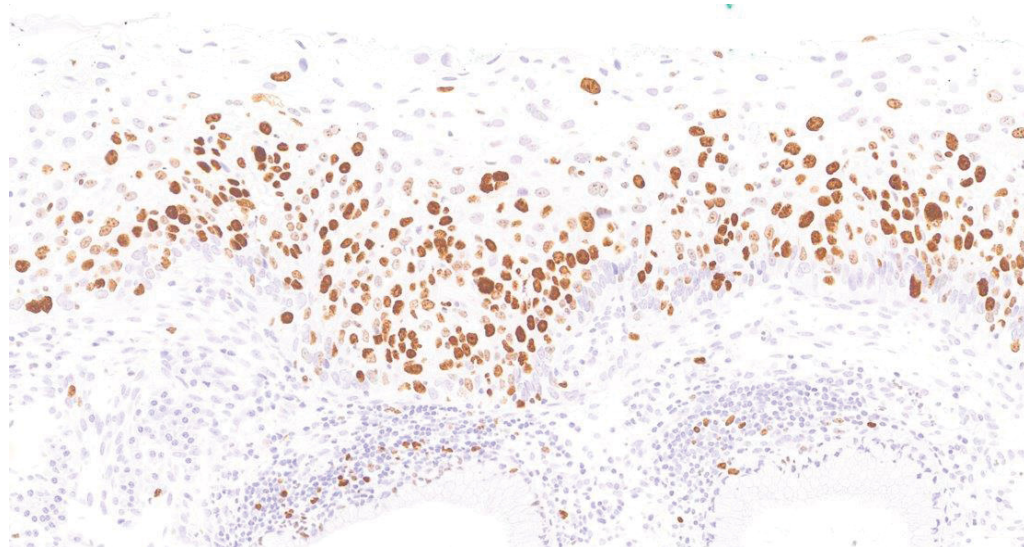
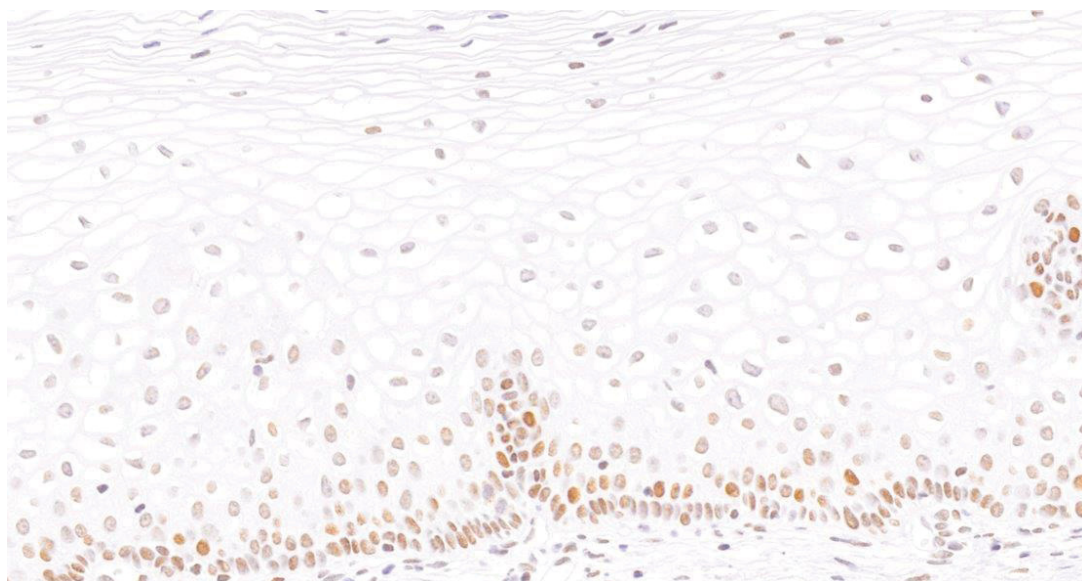
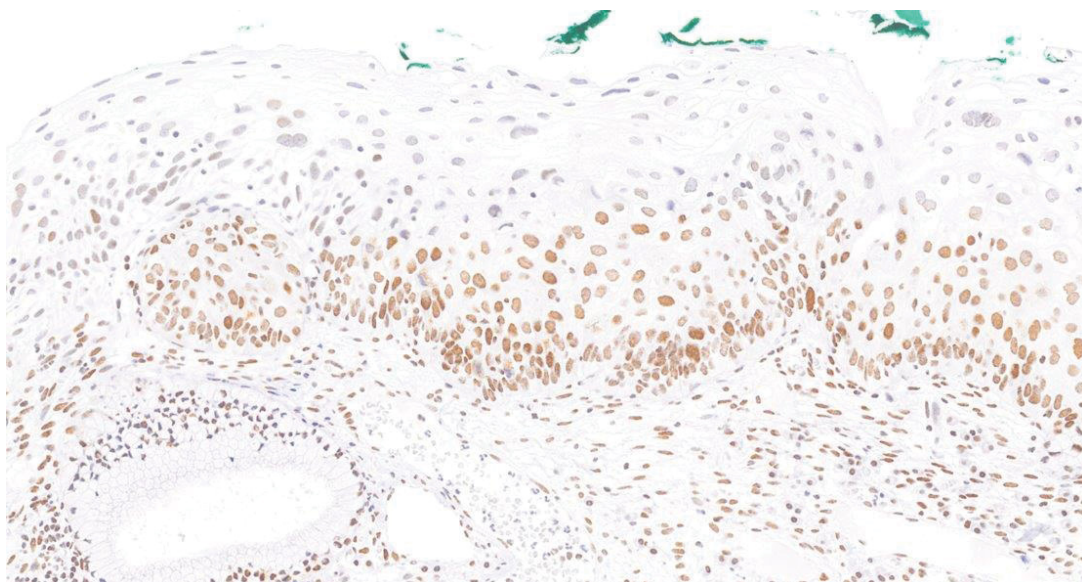


FIGURA 13 - EXPRESSÃO DA GEMININA

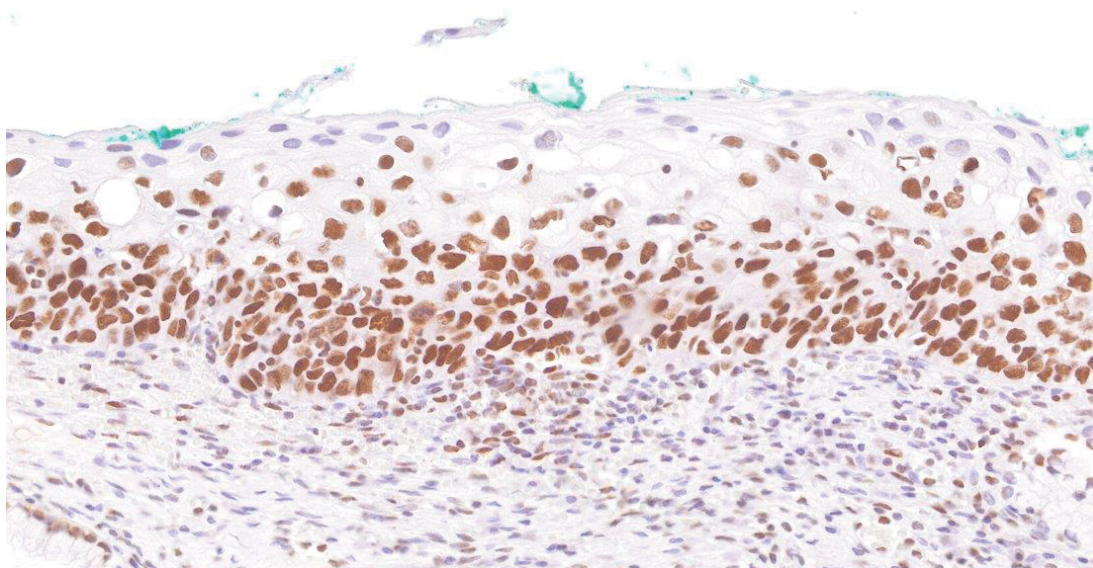
Negativo



NIC 1



NIC 2-3



7 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo principal determinar a taxa de conizações negativas do serviço, bem como identificar fatores de risco que pudessem prever uma maior chance para esse resultado. É importante destacar também que é o primeiro trabalho na literatura que estuda a aplicação de geminina nos casos de cones negativos.

Nosso número de conizações negativas (122) foi notável quando vemos que, dentro dos estudos já descritos na literatura, este valor geralmente é abaixo de 100 (variando de 34 a 140). Como a NIC 1 é manejada de forma expectante devido seu comportamento benigno com altas taxas de regressão espontânea, nossa definição de cone negativo incluiu ausência de lesão intraepitelial e também a NIC 1, assim como fizeram os autores Witt, Zhang, Walakalvar e Kuroki (KUROKI et al., 2016; WALAVALKAR et al., 2016; WITT et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Isso também possibilitou que nossa amostragem fosse maior. Outra semelhança com a maioria dos autores é o desenho do estudo, realizado de forma retrospectiva, e a metodologia de revisão do material e de realização de novos recortes, que foi similar a Golbang, Thompson, Carrig, Nam e Weigl (CARRIGG et al., 2013; GOLBANG et al., 1997; NAM et al., 2015; THOMPSON et al., 2002; WEIGL et al., 2006). A maioria dos autores considerou apenas a técnica de conização por CAF, que realmente é a mais realizada atualmente. Em nosso trabalho, consideramos também a conização por bisturi a frio e o SWETZ, que são opções utilizadas quando a ZT é do tipo 2 ou 3. Isso foi um ponto positivo, pois ao considerar apenas a CAF, diversos autores limitaram seus estudos apenas à ZT totalmente visível. Além disso, nenhum trabalho incluiu o SWETZ, uma técnica cirúrgica recentemente implantada no serviço.

Como erros diagnósticos nas citologias (falso positivos) podem contribuir com a incidência de cones negativos, a revisão do diagnóstico citológico primário nestes casos é de importante avaliação (GOLBANG et al., 1997; WEIGL et al., 2006). Entretanto, as lâminas dos exames de citologia oncótica deste trabalho não foram revisadas, já que a maioria das pacientes realizou o rastreio nas unidades básicas de saúde de Curitiba e de outros municípios do estado do Paraná, tornando impraticável o acesso a este material. Alguns autores também realizaram a revisão das lâminas da curetagem endocervical – em nosso serviço esta não é uma amostragem realizada rotineiramente.

Em relação à indicação da EZT, alguns autores utilizaram somente ver e tratar, e outros somente NIC 2-3 comprovada por biópsia. Neste quesito, nossa amostra foi heterogênea pois consideramos ambas as indicações de conização. Nossos índices de biópsia pré procedimento foram semelhantes no grupo de cones negativos (52,46%) e no grupo controle (58,62%), com p -valor $>0,05$. Não podemos, portanto, inferir que a biópsia cervical esteja relacionada a uma maior probabilidade de cones negativos, conforme foi descrito por Moselhi *et al.* (MOSELHI *et al.*, 2002). Para Denny *et al.*, a biópsia depende muito da capacidade do colposcopista de identificar a área mais anormal do colo – caso o realizador não seja especializado, torna-se um procedimento potencialmente aleatório. Tal como nosso trabalho, ele não encontrou diferença estatística na taxa de cones negativos em pacientes que fizeram ver e tratar ou com biópsia prévia, inferindo que a biópsia pode ser não confiável e não reduz a ocorrência de resultados negativos (DENNY *et al.*, 1995).

O intervalo de tempo entre a realização da biópsia e a conização deste estudo foi de 122 dias, próximo ao de Munmany, que foi de 102 dias (MUNMANY *et al.*, 2018). Apesar de não apresentar significância estatística, esse intervalo de tempo foi maior no grupo de cones negativos, o que fortalece a teoria de que, quanto maior o tempo para o procedimento, maior a probabilidade de regressão da lesão, como sugerido por Zhang *et al.* (ZHANG *et al.*, 2015).

A incidência de cones negativos é um importante fator indicativo do controle de qualidade de um serviço de colposcopia. Após a revisão histopatológica, nossa taxa de biópsias falso positivas foi de 6,25% (4/64), um valor abaixo do encontrado por Golbang *et al.* (24%) e Koc *et al.* (52%), porém acima da pesquisa de Witt *et al.*, que não encontrou nenhum resultado falso positivo (GOLBANG *et al.*, 1997; KOC; SAHIN; AYAS, 2013; WITT *et al.*, 2012). Já a taxa de cones falso negativos foi de 10,88% (16/147), muito próximo ao resultado de Weigl *et al.*, que foi 10,6% (WEIGL *et al.*, 2006). Além disso, após a etapa nos novos recortes, encontramos 6,87% de lesões ocultas que não haviam sido amostradas antes ($9/131 = 6,87\%$), um valor abaixo do de Golbang (10%) e de Thompson (13%) (GOLBANG *et al.*, 1997; THOMPSON *et al.*, 2002). Salienta-se que a releitura das lâminas e a realização dos recortes profundos foi fundamental para a identificação de cones falso negativos – quiçá a etapa mais importante e que mais identificou erros diagnósticos em nosso estudo. Após toda a revisão da patologia, tivemos um total de 11,93% (122/1022) de cones verdadeiramente negativos. Conforme o artigo de revisão de Lorensen e

Zanine, este valor está em conformidade com os resultados da literatura, que variam de 10,6 até 34% (LORENSET; ZANINE, 2022).

Em relação à imuno-histoquímica, apenas as pesquisas de Koc e Nan fizeram a dupla avaliação com p16 e Ki-67. Outros autores fizeram apenas p16. Nós tivemos 20,49% (25 pacientes) de cones negativos com marcador p16 positivo, um valor acima do encontrado por Carrig (13%) e Mummany (nenhum caso) (CARRIGG et al., 2013; KOC; SAHIN; AYAS, 2013; MUNMANY et al., 2017; NAM et al., 2015). O que influenciou essa diferença foi que estes dois autores consideraram como cone negativo apenas a completa ausência de lesão, e em nosso estudo, consideramos também a NIC 1. Como já descrito anteriormente, encontramos diferença estatística quando analisamos a imuno-histoquímica do p16 e Ki-67 distinguindo entre ausência de malignidade e NIC1. Uma meta-análise avaliou todos os métodos e interpretação de p16, correlacionando o grau citológico/histológico (de biópsias, cones e histerectomias) da anormalidade cervical e a expressão de p16. Na histologia, em média, 2% das biópsias normais e 38% das NIC 1 mostraram coloração difusa para p16, o que está de acordo com nossos achados (TSOUMPOU et al., 2009).

Em se tratando do Ki-67, os critérios de classificação para positividade e intensidade variam muito entre os autores na literatura. Mandal *et al.* correlacionaram o grau de expressão do marcador com o grau das lesões precursoras em biópsias cervicais, classificando de maneira semiquantitativa os terços acometidos do epitélio, e encontrou que todos os espécimes normais não expressaram Ki-67 além do terço inferior do epitélio, e 54,9% dos NIC 1 e 77,5% das lesões de alto grau tiveram expressão anormal do marcador (MANDAL et al., 2020). O estudo de Calil encontrou expressão de Ki-67 em 29% do epitélio normal, 34% de NIC 1 e 85% de NIC 2-3, considerando como positividade mais de 5% das células basais com núcleos corados. (CALIL et al., 2014). Em nosso trabalho, não avaliamos o acometimento das porções do epitélio, apenas a porcentagem de positividade, e encontramos que 25% dos casos de ausência de malignidade e 50% dos casos de NIC 1 tiveram expressão intermediária ou alta de Ki-67 ($\geq 31\%$), com diferença estatística ($p=0,023$), diferentemente de Mitildzans *et al.*, que não encontraram diferença entre a expressão de Ki-67 no grupo negativo e NIC 1 (MITILDZANS et al., 2017). Apesar de termos utilizados critérios diferentes, nossos resultados são condizentes com os estudos já publicados e com o fato bem estabelecido deste marcador identificar células em atividade proliferativa.

Nenhum autor avaliou a geminina especificamente no caso de cones negativos. Xing *et al.* encontraram que a geminina foi negativa em 100% das amostras normais do colo, e teve expressão de 1+ em 86,7% e 2+ em 13,3% das NIC 1, respectivamente, utilizando a mesma gradação em cruces que a nossa metodologia. Zheng *et al.*, apesar de terem utilizado outro método de avaliação da geminina, por PCR em tempo real, também encontraram que lesões de alto grau tiveram maior expressão forte de geminina (80,5%) em comparação a lesões de baixo grau (30,6%) e negativas (9,2%). (XING; WANG; WU, 2017; ZHENG *et al.*, 2021) Em nosso estudo, a geminina mostrou coloração $\leq 2+$ em 54,17% dos cones negativos, enquanto que no grupo controle apresentou $\geq 3+$ em 68,97% dos casos, confirmando assim os achados prévios da literatura de que este marcador está associado à células em proliferação e diferenciação (KUKU *et al.*, 2015; WOHLSCHEGEL *et al.*, 2002). Não obstante, é evidente que mais estudos são necessários para avaliar o comportamento da geminina em lesões cervicais.

Nosso tempo mediano de seguimento para o grupo dos cones negativos foi de aproximadamente 15 meses (448 dias). Este é um período de tempo mais curto do que o *follow-up* realizado por muitos autores – cerca de 24 meses (LIVASY; MOORE; VAN LE, 2004; MOSELHI *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-MANFREDI *et al.*, 2013; WALAVALKAR *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015). Infelizmente tivemos perda de seguimento de 41,80% (51/122) dos casos. Por estarmos em um serviço público, com pacientes oriundas não só do município, mas de todo o estado, e com o advento da pandemia da Covid-19, já esperávamos um número alto de perdas.

Se considerarmos todas as alterações de citologia no seguimento, independente do grau, a recidiva foi de 18,85% (23/122), próximo a Walakalkar, que encontrou 25% de citologias alteradas após as conizações (WALAVALKAR *et al.*, 2016). Ao limitarmos apenas as lesões de alto grau, nossa recidiva foi de 8,19% (10/122), um valor maior do que e o encontrado por Rodriguez-Manfredi (3,6%), Moselhi (4,3%) e Zhang (5,81%), mas ainda assim mediano em comparação com a literatura, que varia de 1,16 a 30%, conforme a tabela de Lorenset e Zanine (LORENSET; ZANINE, 2022; MOSELHI *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-MANFREDI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015).

Não identificamos nenhum fator de risco ou padrão de IHQ com significância estatística que pudesse prever maior chance de recidiva. Sabe-se que casos de NIC 1 com p16 positivo podem sofrer regressão espontânea, mas têm uma tendência

maior de progredir para lesão de alto grau do que os casos de NIC 1 com p16 negativo (TSOUMPOU et al., 2009). No entanto, não foi o que ocorreu em nosso estudo: inesperadamente, apenas 2 das 10 pacientes que recidivaram tinham p16 positivo. Golbang encontrou 2 pacientes com neoplasia intraepitelial vaginal (NIVa) no seguimento após cones verdadeiros negativos. Em nosso trabalho, não encontramos nenhuma paciente com recidiva em vagina, mas este fato chama a atenção que é primordial examinar todos os possíveis locais de origem da anormalidade citológica, incluindo a vagina e a vulva, pois talvez cones negativos pudessem ter sido evitados se a NIVa tivesse sido diagnosticada na colposcopia (GOLBANG et al., 1997).

Apesar de o nosso estudo apresentar um número baixo de recidivas de apenas 10 casos, a mediana de dias para que isso acontecesse foi de 432 dias, ou seja, mais de 1 ano. Portanto concordamos com a maioria dos autores quando sugerem que todas as pacientes requerem vigilância rigorosa, com citologia e colposcopia a cada 6 meses por 2 anos, como é realizado no caso de cones positivos para alto grau com margens comprometidas.

7.1 LIMITAÇÕES

Comparando com outros autores, reconhecemos algumas limitações importantes deste trabalho, como a não realização de nenhum tipo de teste para HPV pois são indisponíveis na rede pública, e a amostra heterogênea com diferentes indicações para o procedimento e diversas técnicas cirúrgicas. Outro importante fator que impactou negativamente nossos resultados foi a pandemia do Sars-Cov-19. Normalmente já são esperadas perdas no follow-up, porém 41,8% é um número significativo e que chama a atenção. O COVID intensificou a dificuldade de acesso das pacientes ao hospital para seguimentos, em meio a lockdowns e durante um longo período em que não dispúnhamos de vacina. Realizar busca ativa desta população pode ser uma boa estratégia para mitigar as perdas. Por fim, felizmente nosso número de recidivas pós cone negativo foi baixo, porém acabou limitando esta análise.

7.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Sabe-se que uma porcentagem das pacientes submetidas à conização cervical realmente não vai apresentar lesão na análise anátomopatológica. Dessa forma, é ideal que critérios rígidos sejam seguidos, a fim de somente submeter à conização pacientes que realmente estejam sob risco de lesões precursoras de câncer, evitando assim o sobretratamento e a morbidade associada a este procedimento.

Frente à toda a análise deste estudo, concluímos, com significância estatística, que fatores de risco para cone negativo são idade mais avançada e maior número de gestações, além de estes espécimes apresentarem menor expressão de p16, Ki-67 e geminina. Ressalta-se aqui que a aplicação de imunohistoquímica isolada não substitui o diagnóstico histopatológico e que foi utilizada neste trabalho buscando analisar um comportamento como marcador de risco para recorrência. Mesmo não tendo apresentado significância estatística para outras variáveis, aprimoramos nossas sugestões de *guideline* para conizações negativas, já publicadas em outro trabalho:

- Intervalo de 4 a 6 semanas entre a biópsia e a excisão;
- Reavaliação em curto prazo para pacientes jovens com lesões colposcópicas pequenas e para e pacientes com colposcopia normal imediatamente antes da conização;
- Inclusão total da peça na análise histopatológica
- Realização de recortes profundos rotineiramente no bloco de parafina nos casos em que não seja identificada lesão inicial;
- Aplicação de marcadores de IHQ para identificar áreas displásicas ocultas;
- Teste de HPV de alto risco;
- A mesma abordagem de seguimento de 2 anos usada para cones positivos com margens comprometidas, realizando busca ativa nas pacientes que apresentem perda de seguimento.

Em relação à geminina, mais estudos precisam ser realizados para avaliar o papel deste marcador nas lesões cervicais e no cone negativo.

8 CONCLUSÕES

A taxa de conizações negativas do nosso serviço foi de 11,93%. Fatores de risco para este resultado são maior idade, maior número de gestações e baixa expressão de p16, Ki-67 e de geminina ($p < 0,05$).

As recidivas representaram 8,19% dos cones negativos, e não foram identificados fatores de risco com significância estatística.

O tamanho da lesão colposcópica e a realização de biópsia pré procedimento não tiveram relação com ausência de lesão nas conizações

Pacientes com cone negativo apresentaram, em sua maioria, p16 negativo e baixa expressividade de Ki-67. A geminina também revelou negatividade ou baixa coloração na maioria dos casos, no entanto, sem poder de predizer recorrência.

As pacientes sem doença morfológica no anatomopatológico, mas com marcador positivo para HPV não apresentaram maior recidiva de doença.

REFERÊNCIAS

AGRESTI, A. **An Introduction to Categorical Data Analysis**. 2^a ed. Hoboken, New Jersey: y John Wiley & Sons, Inc., 2007.

ANSCHAU, F.; GUIMARÃES GONÇALVES, M. A. Discordance between cytology and biopsy histology of the cervix: What to consider and what to do. **Acta Cytologica**, v. 55, n. 2, p. 158–162, 2011.

APGAR, B. S.; BROTZMAN, G. L.; SPITZER, M. **Colposcopia: Princípios e Prática**. Rio de Janeiro: Thieme Revinter, 2010.

BORNSTEIN, J. et al. 2011 Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 120, n. 1, p. 166–172, 2012.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

CALIL, L. N. et al. P16INK4a and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. **Pathology Research and Practice**, v. 210, n. 8, p. 482–487, 2014.

CARRIGG, A. et al. Examination of sources of diagnostic error leading to cervical cone biopsies with no evidence of dysplasia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 139, n. 4, p. 422–427, 2013.

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 110, n. 3 SUPPL.2, p. 4–7, 2008.

DASARI, S.; WUDAYAGIRI, R.; VALLURU, L. Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. **Clinica Chimica Acta**, v. 445, p. 7–11, 2015.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DENNY, L. A. et al. Does colposcopically directed punch biopsy reduce the incidence of negative LLETZ? **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 102, n. 7, p. 545–548, 1995.

GOLBANG, P. et al. Investigation of 100 consecutive negative cone biopsies. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 104, n. 1, p. 100–104, 1997.

HOWELLS, R. E. J. et al. How can the incidence of negative specimens resulting from large loop excision of the cervical transformation zone (LLETZ) be reduced? An analysis of negative LLETZ specimens and development of a predictive model. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 107, n. 9, p. 1075–

1082, 2000.

HUH, W. K. Human papillomavirus infection: a concise review of natural history. **Obstetrics & Gynecology**, v. 114, n. 1, p. 139–143, 2009.

IARC, I. A. FOR R. ON C. **The Bethesda System**.

INCA. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>>.

KOC, N.; SAHIN, D.; AYAS, S. Reevaluation of Negative Cone Biopsy Results After A Positive Cervical Biopsy Finding. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 17, n. 2, p. 154–159, 2013.

KUKU, S. et al. Do Cell-Cycle Phase-Specific Markers Predict Disease Grade, Stage, and Outcome in Cervical Carcinoma ? v. 25, n. 6, p. 1066–1072, 2015.

KUROKI, L. M. et al. High-Grade Cervical Dysplasia after Negative Loop Electrosurgical Excision Procedure. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 20, n. 4, p. 300–306, 2016.

LIVASY, C. A.; MOORE, D. T.; VAN LE, L. The clinical significance of a negative loop electrosurgical cone biopsy for high-grade dysplasia. **Obstetrics and Gynecology**, v. 104, n. 2, p. 250–254, 2004.

LORENSET, L. C.; ZANINE, R. M. Reliability of negative cone specimens of the cervix : A review. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 58, p. 151929, 2022.

MANDAL, R. et al. Correlation between p16/Ki-67 Expression and the Grade of Cervical Intraepithelial Neoplasias. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 39, n. 4, p. 384–390, 2020.

MANLEY, K. M. et al. The impact of HPV cervical screening on negative large loop excision of the transformation zone (LLETZ): A comparative cohort study. **Gynecologic Oncology**, v. 141, n. 3, p. 485–491, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA. **Diretrizes Brasileiras para o rastreamento Do Câncer Do Colo Do Útero**. [s.l: s.n.]. v. XXXIII

MITILDZANS, A. et al. Expression of p63 , p53 and Ki-67 in Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Turkish Journal of Pathology**, v. 33, n. 1, p. 9–16, 2017.

MOSCICKI, A.-B. et al. Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital Cancers. **Vaccine.**, v. 20, n. 30, p. F24–F33, 2012.

MOSELHI, M. et al. Follow-up after negative large loop excision of the transformation zone (LLETZ) of the cervix. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 22, n. 2, p. 193–196, 2002.

MUNMANY, M. et al. Small lesion size measured by colposcopy may predict absence of cervical intraepithelial neoplasia in a large loop excision of the transformation zone specimen. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 124, n. 3, p. 495–502, 2017.

MUNMANY, M. et al. Colposcopy evaluation at the time of loop electrosurgical excision procedure may avoid unnecessary treatment. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 22, n. 4, p. 367–374, 2018.

NAM, K. et al. Clinical significance of a negative loop electrosurgical excision procedure biopsy in patients with biopsy-confirmed high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 19, n. 2, p. 103–109, 2015.

PEDRO LUIZ DE OLIVEIRA COSTA NETO. **ESTATÍSTICA**. 2^a ed. [s.l: s.n.].

RODRIGUEZ-MANFREDI, A. et al. Predictors of absence of cervical intraepithelial neoplasia in the conization specimen. **Gynecologic Oncology**, v. 128, n. 2, p. 271–276, 2013.

ROYSTON, J. P. An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. **Applied Statistics**, v. 31, n. 2, p. 115, 1982.

RYU, A. et al. Absence of dysplasia in the excised cervix by a loop electrosurgical excision procedure in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 21, n. 2, p. 87–92, 2010.

SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R. Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes. **Centro Internacional de Pesquisa sobre o Câncer**, p. 132, 2004.

SENBA, M.; MORI, N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. **Oncology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 135–144, 2012.

SILVA, D. C. et al. Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions – A systematic review. **Pathology Research and Practice**, v. 213, n. 7, p. 723–729, 2017.

SINGH, N. et al. Interpretation of p16 Immunohistochemistry In Lower Anogenital Tract Neoplasia. n. August, p. 19, 2018.

SUN, M. et al. Meta-analysis on the performance of p16/Ki-67 dual immunostaining in detecting high-grade cervical intraepithelial neoplasm. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 14, n. 10, p. S587–S593, 2018.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing.**

2021. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

THOMPSON, A. D. et al. Investigation of laser cervical cone biopsies negative for premalignancy or malignancy. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 6, n. 2, p. 84–91, 2002.

TORNESELLO, M. L. et al. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

TSOUMPOU, I. et al. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, n. 3, p. 210–220, 2009.

WALAVALKAR, V. et al. Absence or presence of high-grade squamous intraepithelial lesion in cervical conization specimens a clinicopathologic study of 540 cases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 145, n. 1, p. 96–100, 2016.

WALBOOMERS, J. et al. Human Papillomavirus Is a Necessary Cause. **Journal of Pathology**, v. 189, n. May, p. 12–19, 1999.

WANG, X.; HUANG, X.; ZHANG, Y. Involvement of human papillomaviruses in cervical cancer. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–14, 2018.

WEIGL, G. et al. Investigation of 208 consecutive cases of cervical cone biopsies with regard to indication, negative samples and quality control. **Acta Cytologica**, v. 50, n. 2, p. 185–190, 2006.

WITT, B. L. et al. Negative loop electrosurgical cone biopsy finding following a biopsy diagnosis of high-grade squamous intraepithelial lesion frequency and clinical significance. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 136, n. 10, p. 1259–1261, 2012.

WOHLSCHLEGEL, J. A. et al. Expression of geminin as a marker of cell proliferation in normal tissues and malignancies. **American Journal of Pathology**, v. 161, n. 1, p. 267–273, 2002.

XING, Y.; WANG, C.; WU, J. Expression of geminin, p16, and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 26, p. 1–5, 2017.

ZANINE, R. M. **Doenças do Trato Genital Inferior e Colposcopia: Um Enfoque na Terapêutica**. 1a. ed. [s.l.] Thieme Revinter, 2020.

ZHANG, L. et al. Discrepancies between biopsy-based and excision-based grading of cervical intraepithelial Neoplasia: The important role of time between excision and biopsy. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 34, n. 3, p. 221–227, 2015.

ZHANG, R. et al. p16/Ki67 dual staining improves the detection specificity of

high-grade cervical lesions. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 44, n. 11, p. 2077–2084, 2018.

ZHENG, Z. et al. Prognostic value of HPV 16/18 genotyping and geminin mRNA quantification in low-grade cervical squamous intraepithelial lesion. **Bioengineered**, v. 12, n. 2, p. 11482–11489, 2021.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

APÊNDICE 1 – TABELA DE REVISÃO DE ARTIGOS

Summary of negative cones studies.

Author	Study type	Country	N of cones	Surgical technique	Definition of negative cone	Time period	Negative cone	Mean age (years)	IHQ	Pathology review	Truly negative cones	Follow up time	Recurrence of negative cone
Denny [9]	Prospective	South Africa	250	LEEP	Absence of lesion	Jul/91 to Dec/92	16.4% (41/250)	32.4	Not applied	Not performed	-	-	-
Golbong [10]	Retrospective	Australia	436	Cold knife cone	Absence of lesion	Jan/89 to Aug/94	23% (100/436)	50.6	Not applied	2 pathologists	51% (51/100)	6 months to 5 years	7.8% (4/51)
Howells [6]	Retrospective	United Kingdom	452	LEEP	Absence of lesion	Jan to Dec/98	19% (88/452)	44.4	Not applied	Not performed	-	-	-
Moselhi [11]	Retrospective	United Kingdom	204	LEEP	Absence of lesion	Jan to Dec/96	34% (69/204)	34	Not applied	Not performed	-	24.4 months (22 to 27 months)	4.3% (3/69)
Thopson [12]	Retrospective	Canada	341	Laser	Absence of lesion	Dec/93 to Apr/98	28% (95/341)	39.9	Not applied	2 pathologists	73.68% (70/95)	-	-
Livasy [13]	Retrospective	USA	674	LEEP	Absence of lesion	1991 to 2001	14% (93/674)	29	Not applied	1 pathologist	100% (93/93)	2 years	24% (18/75)
Weigl [14]	Retrospective	Austria	208	LEEP and cold knife cone	Absence of lesion	Jan/01 to Dec/03	10.6% (22/208)	37.2	Not applied	Not performed	-	-	-
Ryu [15]	Prospective	South Korea	192	LEEP	Absence of lesion	Jan/03 to Dec/05	17.7% (34/192)	39.3	Not applied	Not performed	-	28.5 months (3 to 60 months)	3.57% (1/28)
Witt [16]	Retrospective	USA	378	LEEP	Absence of lesion or CIN 1	Jul/03 to Aug/10	24% (73/306)	33.2	Not applied	Not performed	-	25.8 months (1-96 months)	9.58% (7/73)
Carrig [7]	Retrospective	USA	610	Not specified	Absence of lesion	2004 to 2007	17.3% (106/610)	30	p16	3 pathologists	45.3% (253)	5 to 7 years	30% (6/20)
Koc [17]	Retrospective	Turkey	202	LEEP and cold knife cone	Absence of lesion	2005 to 2011	13.3% (27/202)	36.3	Ki-67 e p16	2 pathologists	28% (7/2)	-	-
Rodriguez-Manfredi [18]	Retrospective	Spain	687	LEEP	Absence of lesion	2008 to 2011	16% (110/687)	38.1	Not applied	Not performed	-	22.7 months	26.41% (28/106)
Zhang [8]	Retrospective	China	391	LEEP	Absence of lesion or CIN 1	Jan/09 to Dec/10	26.9% (105/391)	37	p16	2-3 pathologists	100% (105/105)	2 years	1.16% (1/86)
Nan [19]	Retrospective	South Korea	559	LEEP	Absence of lesion	Feb/01 to Dec/10	18.2% (102/559)	40.7	Ki-67 e p16	Not performed	-	37 months (3 a 110 months)	10% (9/90)
Walavalkar [20]	Retrospective	USA	540	LEEP and cold knife cone	Absence of lesion or CIN 1	Jan/09 to Dec/12	26% (140/540)	36	p16	2 pathologists	100% (140/140)	2 years	25% (35/140)
Manley [21]	Retrospective	United Kingdom	802	LEEP	Absence of lesion	Not specified	16.7% (134/802)	<30	Not applied	2 pathologists	100% (134/134)	49 months (6 a 102 months)	9.73% (11/113)
Kuroki [22]	Retrospective	USA	106	LEEP	Absence of lesion or CIN 1	Jan/07 to Dec/14	20% (22/106)	33	Not applied	Not performed	-	13 months	22.7% (5/22)
Munnay [23]	Prospective	Spain	116	LEEP	Absence of lesion	2014	24% (28/116)	37.7	p16	1 pathologist	100% (28/28)	312 days (117 to 429 days)	14.28% (4/28)
Munnay [4]	Prospective	Spain	162	LEEP	Absence of lesion	2014	19.7% (32/162)	40.7	p16	1 pathologist	100% (32/32)	-	-

FONTE: LORENSET; ZANINE, 2022

APÊNDICE 2 – ARTIGO PUBLICADO

Artigo publicado em 26 de fevereiro de 2022 no periódico *Annals of Diagnostic Pathology* – Classificação B2 na área Medicina III para o Quadriênio 2013-2016 no Qualis Periódicos.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35245822/>

Annals of Diagnostic Pathology 58 (2022) 151929



Contents lists available at ScienceDirect

Annals of Diagnostic Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anndiagpath



Review Article

Reliability of negative cone specimens of the cervix: A review

Larissa Chioquetta Lorenset^{*}, Rita Maira Zanine

Department of Gynecology, Clinical Hospital Complex of the Federal University of Paraná, Rua General Carneiro, 181, Alto da Glória, Curitiba, Paraná 80060-900, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Conization
HPV
Negative results
Cervical intraepithelial neoplasia
Ki-67 antigen
p16

ABSTRACT

Objective: Cervical conization specimens with a negative result for high-grade lesion are not infrequent in clinical practice and there are no protocols to address this issue. The purpose of this manuscript is to analyze factors that affect the reliability on these situations and provide recommendations to guide the gynecologists on their practice.

Methods: We searched original articles on Pubmed/Medline database that analyzed negative cones using different combinations of descriptors. There were no restrictions regarding the language or the year of publication.

Results: Nineteen articles were selected and a total of 7310 cones analyzed. The negative excision rate ranged from 10 to 35%. Among the reasons to explain absence of lesion, the most frequent were errors in colposcopy, spontaneous lesion regression, complete removal of small lesions during biopsy, errors in the pre-conization material, false-negative results, and excisional error. Pathological specimen review and application of immunohistochemical biomarkers p16 and Ki-67 seemed to improve accuracy and help in challenging differential diagnosis. Recurrence was detected in up to 30%, as seen in positive cones with compromised margins. Importantly, testing for HPV demonstrated benefits in reducing the number of negative cones.

Conclusions: Several factors could contribute to a negative result in a conization. Our main recommendations include: interval of 4–6 weeks between biopsy and conization, repeat the colposcopy during the excision, consider short-term reevaluation for small colposcopy lesions, perform deep sectioning levels in the paraffin block, use of immunohistochemical markers, HPV testing, and strict surveillance during follow-up as performed for positive cases with compromised margins.

1. Introduction

Cervical cancer is the fourth most frequently diagnosed cancer and the fourth leading cause of cancer deaths in women worldwide [1]. Premalignant cervical lesions, also known as cervical intraepithelial neoplasia (CIN), are precursors of cervical cancer. High risk types of human papilloma virus (HPV) are associated with this cancer in 99.7% of the cases, being one of the highest associations identified in human cancerology [2,3]. Initial cytological screening may identify cervical abnormalities and the colposcopy identifies lesions by the macroscopic changes in the color and in the morphology of the cervical mucosa. The main role of this procedure is to guide the site of biopsy, which is considered the best preoperative approach to confirm CIN [4]. Cervical conization is the treatment of choice when an excisional method is indicated, and it is usually performed in patients over 25 years old, since after this age the rate of spontaneous regression of the lesion is low [5]. Compared to the 3-step management screening (cytology, colposcopy,

and biopsy), the see-and-treat strategy is more cost-effective. It reduces the number of clinical appointments, improves adherence to treatment, minimizes patients' anxiety, and has similar overtreatment rates.

Conization is considered a safe procedure, however, the overtreatment may increase the rates of bleeding, infection, anesthetic complications, risk of abortions, cervical insufficiency, preterm labor, preterm rupture of membranes, and low birth weight [6–8]. A precise indication for conization is challenging due to the frequent absence of high-grade lesion in the excised portion of the cervix. The negative result of conization causes frustration for both patient and clinical care team, especially because of the indeterminate clinical significance. This situation can create doubts about the initial cytological and/or histological diagnosis or if the excision did not include the neoplastic lesion. In addition, it raises questions about how these patients should be managed, since negative cones can induce errors during follow-up of patients with precancerous cervical lesions.

This article provides an overview of the literature regarding negative

^{*} Corresponding author.

E-mail address: lari.lorenset@gmail.com (L.C. Lorenset).

<https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2022.151929>

Available online 26 February 2022

1092-9134/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

cones and the multiple factors that can affect their reliability. It also aims to help gynecologists to understand, manage and follow-up this specific group of patients in order to avoid unnecessary procedures, preserving the health and the obstetric outcome of this population.

2. Material and methods

This is a narrative review. We performed a Pubmed/Medline search with no restrictions of language or year of publication. For the search, we combined the terms "conization", "loop electrosurgical excision procedure (LEEP)", "large loop excision of the transformation zone (LLETZ)", "negative results" and "absence of lesion". We initially found 310 articles. The unique inclusion criterion was the evaluation of original articles whose main objective was the study of conization with a negative result for high-grade lesion. The articles that didn't aim to specifically investigate negative conizations of the cervix were excluded. After applying these criteria, nineteen manuscripts were selected for the final analysis of this study. Exploratory statistical analyses of the sum of data from each article were performed to obtain an overview of the epidemiology of patients' profile and the results of the articles. Quantitative variables were summarized using measures of central tendency.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

3. Results

The selected articles were published between 1995 and 2018. The main findings and used methodologies are summarized in Table 1. A total of 7310 cones were analyzed and the negative cone rate ranged from 10.6 to 34%. The average age of patients was under 40 years. Four studies were prospective, while the other 15 were designed retrospectively. The definition of negative cone was controversial among the studies – 15 authors considered the absolute absence of lesion in the fragment, while another 4 included CIN1 in negative cone criterion as well. Several conization techniques were used: LEEP in 68.42%, LEEP and cold knife conization in 15.78%, cold knife conization in 5.26%, and laser in 5.26% of the studies. Only one manuscript did not specify the technique used.

The main hypotheses for the negative cones in patients with high-grade lesion in cytology, biopsy, and colposcopy included:

- Errors in colposcopy, over grading low-grade lesions as high-grade ones;
- Translocation of abnormal cells from other sites of the lower genital tract in the cytology collection;
- Spontaneous lesion regression in the interval between cytology sample collection, cervical biopsy, and the later conization;
- Complete removal of a focal and small lesion during a cervical biopsy;
- Misvaluation of pre-surgical samples as high-grade lesions (false-positive result);
- Denudation or distortion of the epithelium of the cone specimen as a result of careless handling or thermal artifact;
- High-grade lesion presented in the paraffin tissue block, but not detected in the first pathological analysis (false-negative result);
- Neoplastic area not removed by the conization, remaining in the cervix (excisional error).

There are many risk factors associated with a higher risk of absence of lesion in a cone specimen, such as young women, increase in age, menopause, genital atrophy, parity, use of contraceptives and smoking. In addition, negative or low-grade cytology, biopsy-confirmed CIN2, long interval between biopsy and conization, previous HPV treatment, negative HPV test, low HPV viral load, absence of high-risk HPV and viral types other than 16 or 18 were also related to negative cones. Importantly, particularly for colposcopy features, risk factors comprised

minor findings, lesions involving less than 1 quadrant of the cervix, size of the lesion smaller than 12mm² in colposcopic photographic measurement, unsatisfactory colposcopy, columnar squamous junction not visible (type 3 transformation zone), and a normal colposcopy at the time of conization in patients with high-grade lesion.

A major limitation is that not all studies performed pathological review. Only ten studies carried out a review of the material with pathologists, and from the total number of 860 cones considered initially negative, 684 cones were confirmed as truly negative after deeper levels analysis of the specimen and/or application of biomarkers. The use of immunohistochemistry (IHC) was performed in 7 studies using p16, and two of them also used Ki-67. After this pathological review, the incidence of truly negative cones, compared to the initially negative cones, ranged from 22.64% to 100%. A total of 901 patients were followed-up and it ranged from 3 months to 7 years. The recurrence rate of patients with a negative excision ranged from 1.16% to 30%.

4. Discussion

The articles used several definitions of conization, different examination techniques of the specimen, inconsistent use of markers, and different time ranges from initial screening to conization. Furthermore, a combination of biopsy-proved CIN2/CIN3 with see-and-treat strategy was used. All these factors seem to affect the outcomes reported along with the reliability of a negative cone.

4.1. The pre-surgical biopsy role

Moselhi et al. found a higher negative cone rate when patients underwent pre-surgical biopsy, while Ryu et al. found absence of dysplasia in 17.7% of LEEP samples with CIN2/CIN3 confirmed by biopsy [11,15]. There was a greater chance of predicting absence of lesion in the cone specimen in CIN 2 biopsy compared to CIN3 [19]. Koc et al. reported an average interval between cervical biopsy and conization of 4 weeks and concluded the lesion regression in this short period seemed unlikely [17]. For Zhang et al., the prevalence of negative cone increased according to the biopsy interval range [8]. Furthermore, a Spanish study reexamined patients immediately before the excision and reported that a normal colposcopy increased the risk of negative cones in 229 times [4].

4.2. HPV testing

The study conducted by Ryu et al. showed a low HPV load associated to a negative cone prediction, while Mummany et al. added that viral types other than 16/18 were also predictors of negative cones [15,23]. In another study, 75% of patients with negative HPV test had negative cones [18]. Manley et al. compared two independent cohorts of women who underwent conization before and after the introduction of HPV screening. Around 20% from the pre-HPV cohort and 13.4% from the post-HPV cohort had negative results, demonstrating 25% reduction in negative cone incidence. However, as the prevalence of false-positives remains high and the HPV specificity for low-grade cytology is low, the risk of treating women who have a transient HPV infection may increase. For its higher sensitivity for screening than isolated cytology, HPV testing helps reducing negative cone rates [21].

4.3. Pathology specimen review

The histopathological misdiagnosis may occur because of atrophy, inflammation, and metaplasia [10]. The specimen review, although not always performed, demonstrated major importance for confirming truly negative cones. Thompson et al. reported a false-negative cone rate of 26% due to misinterpretation of the original slides or discovery of lesions in deeper sections of paraffin blocks [12]. Carrig et al. also found that 26% of the initially negative cones were reclassified as positive after review and 28.3% had the pre-surgical material overestimated [7]. For

Table 1
Summary of negative cones studies.

Author	Study type	Country	N of cones	Surgical technique	Definition of negative cone	Time period	Negative cone	Mean age (years)	IHQ	Pathology review	Truly negative cones	N of negative cone follow up	Follow up time	Recurrence of negative cone
Denny [9]	Prospective	South Africa	250	LEEP	Absence of lesion	Jul/91 to Dec/92	16.4% (41/250)	32.4	Not applied	Not performed	-	Not performed	-	-
Golbang [10]	Retrospective	Australia	436	Cold knife cone	Absence of lesion	Jan/09 to Aug/94	23% (100/436)	50.6	Not applied	2 pathologists	51% (51/100)	51	6 months to 5 years	7.6% (4/51)
Howells [6]	Retrospective	United Kingdom	452	LEEP	Absence of lesion	Jan to Dec/98	19% (88/452)	44.4	Not applied	Not performed	-	Not performed	-	-
Moselhi [11]	Retrospective	United Kingdom	204	LEEP	Absence of lesion	Jan to Dec/96	34% (69/204)	34	Not applied	Not performed	-	69	24.4 months (22 to 27 months)	4.3% (3/69)
Thompson [12]	Retrospective	Canada	341	Laser	Absence of lesion	Dec/93 to Apr/98	28% (95/341)	39.9	Not applied	2 pathologists	73.68% (70/95)	Not performed	-	-
Livasy [13]	Retrospective	USA	674	LEEP	Absence of lesion	1991 to 2001	1.4% (93/674)	29	Not applied	1 pathologist	100% (93/93)	75	2 years	2.4% (18/75)
Weigl [14]	Retrospective	Austria	208	LEEP and cold knife cone	Absence of lesion	Jan/01 to Dec/03	10.6% (22/208)	37.2	Not applied	Not performed	-	Not performed	-	-
Ryu [15]	Prospective	South Korea	192	LEEP	Absence of lesion	Jan/03 to Dec/05	17.7% (34/192)	39.3	Not applied	Not performed	-	28	28.5 months (3 to 60 months)	3.57% (1/28)
Witz [16]	Retrospective	USA	378	LEEP	Absence of lesion or CIN 1	Jul/03 to Aug/10	24% (73/306)	33.2	Not applied	Not performed	-	73	25.8 months (1-96 months)	9.56% (7/73)
Carig [7]	Retrospective	USA	610	Not specified	Absence of lesion	2004 to 2007	17.3% (106/610)	30	p16	3 pathologists	45.3% (24/53)	20	5 to 7 years	30% (6/20)
Koc [17]	Retrospective	Turkey	202	LEEP and cold knife cone	Absence of lesion	2005 to 2011	13.3% (27/202)	36.3	Ki-67 e p16	2 pathologists	28% (7/25)	Not performed	-	-
Rodriguez-Manfredi [18]	Retrospective	Spain	687	LEEP	Absence of lesion	2008 to 2011	16% (110/687)	38.1	Not applied	Not performed	-	106	22.7 months	26.41% (28/106)
Zhang [8]	Retrospective	China	391	LEEP	Absence of lesion or CIN 1	Jan/09 to Dec/10	26.9% (105/391)	37	p16	2-3 pathologists	100% (105/105)	96	2 years	1.16% (1/86)
Nan [19]	Retrospective	South Korea	559	LEEP	Absence of lesion	Feb/01 to Dec/10	18.2% (102/559)	40.7	Ki-67 e p16	Not performed	-	90	37 months (3 a 110 months)	10% (9/90)
Walavalkar [20]	Retrospective	USA	540	LEEP and cold knife cone	Absence of lesion or CIN 1	Jan/09 to Dec/12	26% (140/540)	36	p16	2 pathologists	100% (140/140)	140	2 years	25% (35/140)
Manley [21]	Retrospective	United Kingdom	802	LEEP	Absence of lesion	Not specified	16.7% (134/802)	<30	Not applied	2 pathologists	100% (134/134)	113	49 months (6 a 102 months)	9.73% (11/113)
Kuroki [22]	Retrospective	USA	106	LEEP	Absence of lesion or CIN 1	Jan/07 to Dec/14	20% (22/106)	33	Not applied	Not performed	-	22	13 months	22.7% (5/22)
Mummay [23]	Prospective	Spain	116	LEEP	Absence of lesion	2014	24% (28/116)	37.7	p16	1 pathologist	100% (28/28)	28	312 days (117 to 429 days)	14.28% (4/28)
Mummay [4]	Prospective	Spain	162	LEEP	Absence of lesion	2014	19.7% (32/162)	40.7	p16	1 pathologist	100% (32/32)	Not performed	-	-

Golbang et al., the reassessment of the cytology, colposcopy and specially the histologic material in deeper sectioning levels revealed CIN initially absent in 21 of 99 patients, questioning the lack of concern with false-positive results [10]. In another study, 50% of cytology samples and 24% of pre-surgical biopsies were overestimated – one-third of negative results could be assigned to overdiagnosis [20]. In Koc's study, 52% of negative cones were due to incorrect evaluation in the first biopsy, differing from Witt's research, that also reviewed the pre-surgical biopsies with no incorrect diagnoses and detected 24% of negative cones in patients with high-grade lesion biopsy [16,17].

4.4. Immunohistochemistry

Biopsies analysis still bears from inter-observer subjectivity. IHC analysis is beneficial for the study of negative cones, but only 7 authors have performed it. P16 protein helps to identify and reclassify hidden dysplasia in biopsies of high-risk HPV patients. A study that applied p16 to the most atypical areas of cones considered negative after anatomopathological review identified dysplasia in 7 (13%) additional specimens [7]. Munmany et al. also applied p16 to the negative LEEP specimens to identify occult dysplasia, and all were negative for p16 staining [4,23]. A Chinese study used p16 only in patients with CIN2, and the high-score staining cases were less likely to have a negative cone compared to low-score cases [8]. Another study performed p16 and Ki-67 and found benefits for specimens with electrocauterization artifacts [19]. Ki-67 and p16 staining are useful before making a definitive diagnosis, especially in difficult differential diagnosis situations [7,12].

4.5. Recurrence

Women with negative cones may be at low risk for developing subsequent abnormalities [11]. Walavalkar et al. found lower recurrence rates in women with negative cones compared to those with positive cones, regardless of the margin status [20]. Another study detected that 10% of patients with negative cones, despite biopsy confirmed lesion, had high-grade abnormality during follow-up [16]. In contrast, for Livasy et al., the negative cone recurrence in patients with biopsy confirmed high-grade lesion was greater than the positive cone recurrence with clear margins (24% vs 15%) in short-term follow-up [13]. Carrig et al. reported that 30% of patients with truly negative cones had dysplasia or carcinoma during follow-up, emphasizing the need for careful surveillance [7]. For Rodriguez-Manfredi et al., women with negative cones didn't have less risk of developing CIN at follow-up, and for Munmany et al., the recurrence was lower for patients with lesions <1.2mm² and HPV types other than 16/18 [18,23].

4.6. Follow-up

There is no standard follow-up time. Although absence of dysplasia isn't a predictor of recurrence, it doesn't guarantee absence of disease during follow-up [15,19,22]. All patients require strict surveillance, regardless of colposcopy findings, residual disease, or treatment strategy. The same 2-year follow-up recommended for positive conizations with compromised margins should be performed [4,15,16,19,22,23].

4.7. How to avoid it?

Patients with minor findings, small colposcopic lesions, negative HPV test, low viral load, and HPV types other than 16/18 are more likely to have negative cones and shouldn't undergo immediate excision. A careful reassessment before conization should be performed, since lesion regression may occur [4,14,18].

Cytology and biopsy can damage the cervical epithelium. An interval of 4–6 weeks between evaluation and conization is recommended for epithelial repair. The distinctions between degenerative and regenerative changes are more difficult to be performed in shorter intervals [10].

However, long intervals increase the likelihood of negative cones because many cases can regress spontaneously in a few months [8]. For intervals between cytology and colposcopy greater than 3 months, repeating the cytology can reduce iatrogenic risk, since 40% of CIN2 biopsies and 32% of CIN3 biopsies regress [21]. Colposcopy measurement can avoid unnecessary cones. Lesions <2.5 mm have a 5 times greater risk of regression than larger ones [23]. For Munmany et al., 82.3% of women with normal colposcopy at LEEP did not have dysplasia, therefore a normal exam accurately predicts low probability of lesion [4].

Moreover, improvements in pathological assessment can reduce negative excision rates. Several studies suggested that limiting diagnostic errors in cytological/histological diagnosis before conizations is the first step to reduce unnecessary procedures [7,14,20]. Furthermore, deep sectioning levels of paraffin blocks should be routinely assessed in negative cones [7,10,12]. In these cases, the use of p16, Ki-67, and HPV genotyping are also recommended to avoid hidden dysplastic regions [7,21].

5. Conclusions

A negative cone result is unsatisfactory for both the patient and the gynecologist, and many factors can affect its reliability. There are no current protocols or guidelines for screening and treatment of precancerous lesions which specifically address this topic. After the presented analysis of the literature, we recommend the following guidelines for clinicians and pathologists:

- 4 to 6 weeks interval between biopsy and excision.
- Short-term reevaluation for young patients with small colposcopic lesions and patients with normal colposcopy immediately before the conization.
- Routinely deep sectioning levels in the paraffin block.
- IHC markers to identify hidden dysplastic areas.
- High-risk HPV testing.
- The same 2-year follow-up approach used for positive cones with compromised margins.

Abbreviations and acronyms

CIN	Cervical intraepithelial neoplasia
IHC	Immunohistochemical
HPV	Human papilloma virus
LEEP	Loop electrosurgical excision procedure
LLTZ	Large loop excision of the transformation zone

Institutional Review Board (IRB) status

Not applicable.

Financial support

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of competing interest

There are no conflicts of interest.

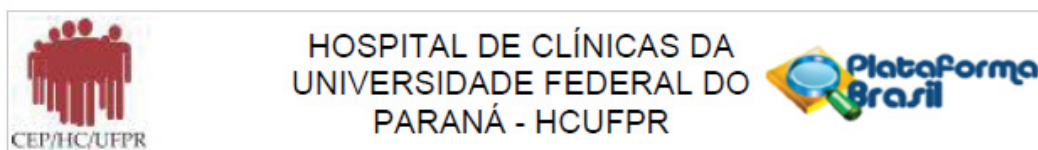
Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to the staff of the Ambulatory of Colposcopy and Lower Genital Tract Disease for their support.

References

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [2] Walboomers J, Jacobs M, Manos M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause. *J Pathol* 1999;189(May):12-9.
- [3] Huh WK. Human papillomavirus infection: a concise review of natural history. *Obstet Gynecol* 2009;114(1):139-43. <https://doi.org/10.1001/archfam.3.10.355>.
- [4] Munumany M, Torné A, Nonell R, et al. Colposcopy evaluation at the time of loop electroresection procedure may avoid unnecessary treatment. *J Low Genit Tract Dis* 2018;22(4):367-74. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000410>.
- [5] Ministério da Saúde, INCA. Diretrizes Brasileiras Para o Rastreamento Do Câncer Do Colo Do Útero Vol XXXIII; 2016. http://bvuma.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_uterio.pdf.
- [6] Howells REJ, O'Mahony F, Tucker H, Millinship J, Jones PW, Redman GWE. How can the incidence of negative specimens resulting from large loop excision of the cervical transformation zone (LLETZ) be reduced? An analysis of negative LLETZ specimens and development of a predictive model. *Br J Obstet Gynaecol* 2000;107(9):1075-82. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2000.tb11103.x>.
- [7] Carrigg A, Teschendorf C, Amaro D, et al. Examination of sources of diagnostic error leading to cervical cone biopsies with no evidence of dysplasia. *Am J Clin Pathol* 2013;139(4):422-7. <https://doi.org/10.1309/AJCP6B5D0SNGQLHQ>.
- [8] Zhang L, Li Q, Zhao M, Jia L, Zhang Y. Discrepancies between biopsy-based and excision-based grading of cervical intraepithelial neoplasia: the important role of time between excision and biopsy. *Int J Gynecol Pathol* 2015;34(3):221-7. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000152>.
- [9] Denny LA, Goeters R, Dehaeck K, Bloch B. Does colposcopically directed punch biopsy reduce the incidence of negative LLETZ? *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 1995;102(7):545-9. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1995.tb11353.x>.
- [10] Golbang P, Scurry J, de Jong S, et al. Investigation of 100 consecutive negative cone biopsies. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 1997;104(1):100-4. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1997.tb10658.x>.
- [11] Moselhi M, Howells REJ, Hauke A, Flander A. Follow-up after negative large loop excision of the transformation zone (LLETZ) of the cervix. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* 2002;22(2):193-6. <https://doi.org/10.1080/01443610120113409>.
- [12] Thompson AD, Duggan MA, Nation J, Brasher PMA. Investigation of laser cervical cone biopsies negative for premalignancy or malignancy. *J Low Genit Tract Dis* 2002;6(2):84-91. <https://doi.org/10.1097/00123360-200204000-00004>.
- [13] Livary CA, Moore DT, Van Le L. The clinical significance of a negative loop electroresection cone biopsy for high-grade dysplasia. *Obstet Gynecol* 2004;104(2):250-4. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000132803.83049.84>.
- [14] Weigl G, Pokieser W, Schuller B, et al. Investigation of 200 consecutive cases of cervical cone biopsies with regard to indication, negative samples and quality control. *Acta Cytol* 2006;50(2):185-90. <https://doi.org/10.1159/000325929>.
- [15] Ryu A, Nam K, Chung S, et al. Absence of dysplasia in the excised cervix by a loop electroresection procedure in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *J Gynecol Oncol* 2010;21(2):87-92. <https://doi.org/10.3802/jgo.2010.21.2.87>.
- [16] Witt BL, Factor RE, Jarboe EA, Layfield LJ. Negative loop electroresection cone biopsy finding following a biopsy diagnosis of high-grade squamous intraepithelial lesion frequency and clinical significance. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136(10):1259-61. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0494-OA>.
- [17] Koc N, Sahin D, Ayaz S. Reevaluation of negative cone biopsy results after a positive cervical biopsy finding. *J Low Genit Tract Dis* 2013;17(2):154-9. <https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e31825c33f9>.
- [18] Rodriguez-Manfredi A, Alonso I, Del Pino M, Fusté P, Torné A, Ordi J. Predictors of absence of cervical intraepithelial neoplasia in the conization specimen. *Gynecol Oncol* 2013;128(2):271-6. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.10.020>.
- [19] Nam K, Ryu A, Jeon S, Kim J, Kwak J, Park B. Clinical significance of a negative loop electroresection procedure biopsy in patients with biopsy-confirmed high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Low Genit Tract Dis* 2015;19(2):103-9. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000061>.
- [20] Walavalkar V, Stockl T, Owens CL, et al. Absence or presence of high-grade squamous intraepithelial lesion in cervical conization specimens: a clinicopathologic study of 540 cases. *Am J Clin Pathol* 2016;145(1):96-100. <https://doi.org/10.1093/AJCP/AQV007>.
- [21] Manley KM, Wills AK, Morris GC, Hogg JL, López Bernal A, Murdoch JB. The impact of HPV cervical screening on negative large loop excision of the transformation zone (LLETZ): a comparative cohort study. *Gynecol Oncol* 2016;141(3):485-91. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.03.032>.
- [22] Kuroki LM, James-Nywening L, Wu N, et al. High-grade cervical dysplasia after negative loop electroresection procedure. *J Low Genit Tract Dis* 2016;20(4):300-6. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000260>.
- [23] Munumany M, Marimon L, Cardona M, et al. Small lesion size measured by colposcopy may predict absence of cervical intraepithelial neoplasia in a large loop excision of the transformation zone specimen. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 2017;124(3):495-502. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.14247>.

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de biomarcadores em lesões cervicais uterinas

Pesquisador: Rita Maira Zanine

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43041221.8.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.571.045

Apresentação do Projeto:

Expressão de biomarcadores em lesões cervicais uterinas

Pesquisador Principal: Dra Rita Maira Zanine

Colaboradoras: Larissa Chioquetta Lorenset / Marcela Clarissa Padeski Ferreira

Grande Área 4. Ciências da Saúde

Saúde Coletiva / Saúde Pública

O estudo irá avaliar as pacientes submetidas à exérese de zona de transformação no CHC-UFPR, os fatores de risco associados às conizações negativas, comportamento de novos biomarcadores e taxas de recorrência das lesões intraepiteliais de alto grau após o tratamento cirúrgico. O estudo será retrospectivo, através de análise de dados de prontuários médicos e de peças de anatomia patológica (produtos de conização uterina, cirurgia de alta frequência uterina e biópsias cervicais). Serão incluídas no estudo as pacientes submetidas à exérese da zona de transformação do colo uterino entre 01/01/2005 a 01/03/2020, com número aproximado de 1000 pacientes. Serão excluídas pacientes gestantes e puérperas, pacientes com prontuários incompletos, submetidas à histerectomia, com diagnóstico de adenocarcinoma ou carcinoma do colo uterino. Espera-se identificar fatores de risco potenciais para a ocorrência de cones negativos e recorrência de lesões

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.080-900

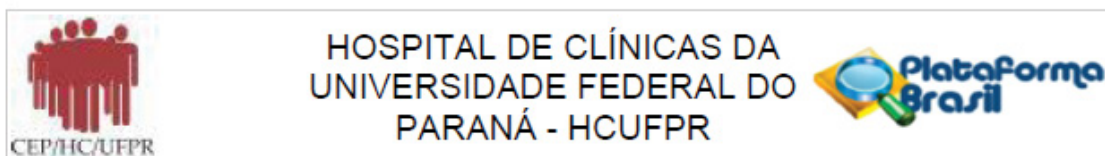
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3380-1041

Fax: (41)3380-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.571.045

de alto grau nas pacientes estudadas, assim como avaliar a expressão de biomarcadores nas lesões precursoras do câncer de colo uterino. Assim, este estudo visa reduzir as intervenções no colo do útero, principalmente em mulheres jovens, ponderando as consequências em seu futuro obstétrico, além de realização de acompanhamento clínico rigoroso em pacientes com maior chance de recidiva das lesões.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão de biomarcadores em lesões do colo uterino de pacientes submetidas à exérese da zona de transformação.

- Objetivos Secundários

- a) Avaliar o perfil sócio-demográfico e clínico das pacientes submetidas a tratamento cirúrgico no Serviço de Patologia do Complexo Hospital de Clínicas;
- b) Avaliar ocorrência de recidivas após o tratamento cirúrgico de neoplasias intraepiteliais e os fatores de risco para sua ocorrência;
- c) Avaliar a frequência de cones negativos entre as pacientes operadas;
- d) Verificar a associação entre peça de cone negativa e tamanho da lesão colposcópica;
- e) Analisar o papel da biópsia pré-procedimento na taxa de conização negativa;
- f) Avaliar a reação de biomarcadores como o p16, Ki-67, geminina e CDK7 nas peças cirúrgicas;
- g) Definir o significado clínico da paciente sem doença morfológica no anatomopatológico, mas com marcador positivo para HPV

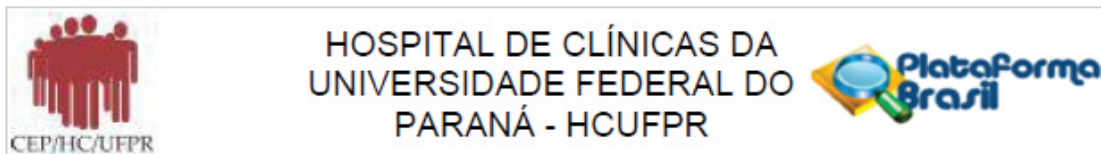
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por se tratar de uma pesquisa retrospectiva os riscos são escassos, mas envolvem perda de confidencialidade e extravios de dados, lâminas, blocos de parafina e documentos. Tomar-se-ão todas medidas cabíveis para minimizá-los, como avaliação de prontuários apenas no Serviço de Arquivo Hospitalar e manipulação de lâminas no Serviço de Anatomia Patológica em conjunto com médico patologista.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com o GLOBOCAN, no ano de 2018, houve 569.847 novos casos de câncer cervical no mundo, com 311.365 mortes pela doença, tomando-se este o quarto câncer mais frequentemente

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181	
Bairro: Alto da Glória	CEP: 80.080-900
UF: PR	Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041	Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.571.045

diagnosticado e a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres (BRAY, 2018).

Especificamente no Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para novos casos de câncer de colo do útero para o ano de 2020 é de 16.590.

Os últimos dados disponíveis sobre mortalidade, de 2017, mostram que o número de óbitos contabilizados por esta causa foi de 6.385. Para o sexo feminino, este tipo de câncer ocupa o 3o lugar em incidência e o 4o lugar em mortalidade (INCA, 2020). As lesões pré-cancerosas do colo do útero, chamadas de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), podem ser detectadas através de rastreio e podem ser tratadas para evitar a progressão para o câncer. Assim, esta neoplasia é evitável devido ao seu longo estágio pré-invasivo (HUH, 2009).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os Termos de apresentação obrigatória: Folha de Rosto, Brochura da Pesquisa, Cartas de Anuência dos Departamentos de GO, Unidade Materno-Infantil e Anatomia Patológica, Cronograma, Dispensa do TCLE e Orçamento.

Recomendações:

É importante que todo material de Anatomia Patológica esteja adequadamente acondicionado e identificado, de forma a evitar perdas, extravios ou inviabilizar tecnicamente sua análise e também sua adequada guarda dos materiais produzidos pela pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

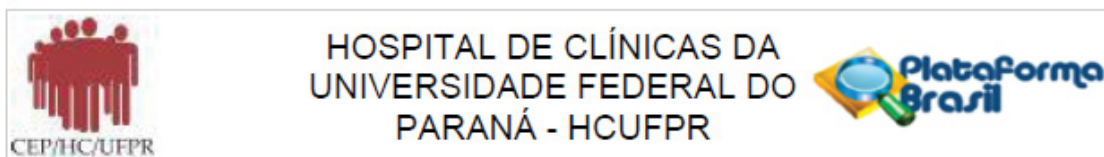
Projeto de Pesquisa Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto, conforme proposto, para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Os documentos da pesquisa devem ser mantidos arquivados.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
 Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3380-1041 Fax: (41)3380-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.571.045

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1661837.pdf	07/02/2021 23:19:25		Aceito
Outros	CECKLIST_DOCUMENTAL_PROJETO_PESQUISA.pdf	07/02/2021 23:08:09	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Outros	CECKLIST_DOCUMENTAL_PROJETO_PESQUISA.docx	07/02/2021 21:59:23	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Outros	DECLARACAO_CONCORDANCIA_DE_PARTAMENTO.docx	07/02/2021 21:45:36	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Outros	DECLARACAO_CONCORDANCIA_UNIDADE_MATERNO_INFANTIL.doc	07/02/2021 21:44:56	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Outros	DECLARACAO_CONCORDANCIA_UNIDADE_DE_ANATOMIA_PATOLOGICA.doc	07/02/2021 21:44:27	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	BROCHURA_PESQUISA_FINAL.pdf	07/02/2021 09:19:22	Marcela Clarisa Padeski Ferreira	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	07/02/2021 09:17:15	Marcela Clarisa Padeski Ferreira	Aceito
Outros	DECLARACAO_ANUENCIA_DEPARTAMENTO_PATOLOGIA.pdf	07/02/2021 09:16:44	Marcela Clarisa Padeski Ferreira	Aceito
Outros	DECLARACAO_ANUENCIA_DEPARTAMENTO_PATOLOGIA.doc	07/02/2021 09:16:01	Marcela Clarisa Padeski Ferreira	Aceito
Brochura Pesquisa	BROCHURA_PESQUISA_FINAL.doc	07/02/2021 09:09:13	Marcela Clarisa Padeski Ferreira	Aceito
Outros	DECLARACAO_CONCORDANCIA_UNIDADE_MATERNO_INFANTIL.pdf	03/01/2021 18:33:34	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Outros	DECLARACAO_CONCORDANCIA_UNIDADE_DE_ANATOMIA_PATOLOGICA.pdf	03/01/2021 18:32:57	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_TERMOS_CONSENTIMENTO.docx	15/11/2020 21:11:18	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Outros	DECLARACAO_AUSENCIA_CUSTOS.doc	15/11/2020 21:10:51	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Outros	CARTA_ENCAMINHAMENTO_PESQUISADOR_AO_CEP.doc	15/11/2020 21:09:37	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Outros	DECLARACAO_ORIENTADOR_DO_PR	15/11/2020	LARISSA	Aceito

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

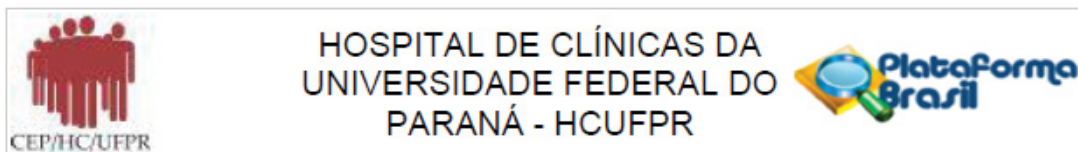
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.571.045

Outros	JETO.doc	21:06:58	CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Declaração de concordância	DECLARACAO_CONCORDANCIA_DE PARTAMENTO.pdf	15/11/2020 21:05:40	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_COMPROMISSO_EQUIPE_PESQUISA.doc	15/11/2020 21:00:39	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_COMPROMISSO_EQUIPE_PESQUISA.pdf	15/11/2020 20:59:46	LARISSA CHIOQUETTA LORENSET	Aceito
Outros	DECLARACAO_ORIENTADOR_DO_PROJETO.pdf	14/11/2020 22:04:10	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	DECLARACAO_AUSENCIA_CUSTODIA.pdf	14/11/2020 22:03:45	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	CARTA_ENCAMINHAMENTO_PESQUISADOR_AO_CEP.pdf	14/11/2020 22:01:37	Rita Maira Zanine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_TERMOS_CONSENTIMENTO.pdf	14/11/2020 22:00:54	Rita Maira Zanine	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 03 de Março de 2021

Assinado por:
Niazy Ramos Filho
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3380-1041 Fax: (41)3380-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br