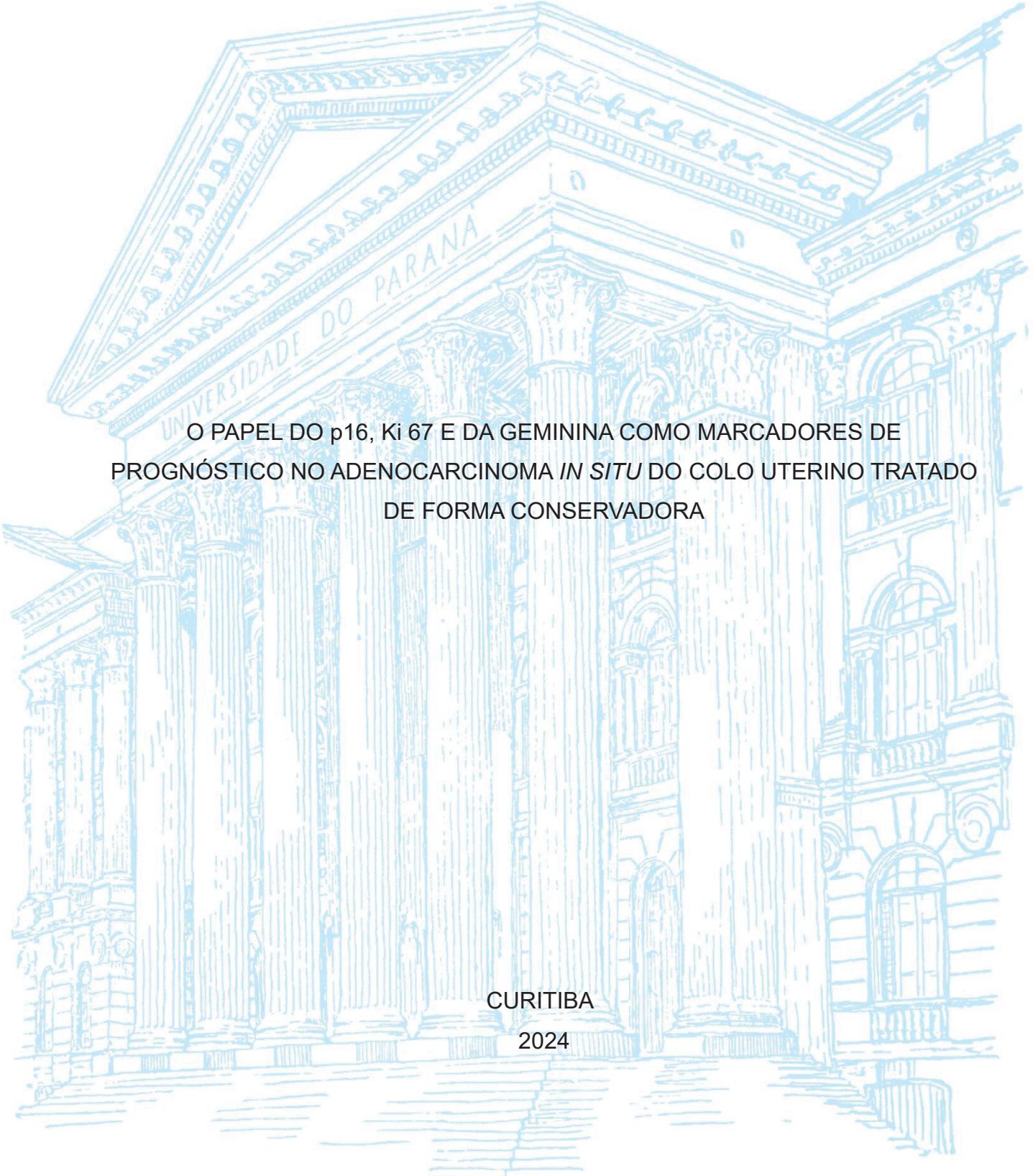


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA PEREIRA PINTO



O PAPEL DO p16, Ki 67 E DA GEMININA COMO MARCADORES DE
PROGNÓSTICO NO ADENOCARCINOMA *IN SITU* DO COLO UTERINO TRATADO
DE FORMA CONSERVADORA

CURITIBA

2024

PATRICIA PEREIRA PINTO

O PAPEL DO p16, Ki 67 E DA GEMININA COMO MARCADORES DE
PROGNÓSTICO NO ADENOCARCINOMA *IN SITU* DO COLO UTERINO TRATADO
DE FORMA CONSERVADORA

Dissertação apresentada ao programa 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 e Saúde da Mulher

Orientador: Prof. Dra. Rita Maira Zanine

CURITIBA

2024

P659 Pinto, Patrícia Pereira

O papel do p16, ki 67 e da geminina como marcadores de prognóstico no adenocarcinoma in situ do colo uterino tratado de forma conservadora [recurso eletrônico] / Patrícia Pereira Pinto. – Curitiba, 2024.

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. Adenocarcinoma in situ. 2. Colo do útero. 3. Geminina, 4. Imuno-Histoquímica. 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.

NLM QZ 365

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991



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 **PATRICIA PEREIRA PINTO** intitulada: **O PAPEL DO p16, Ki 67 E DA GEMININA COMO MARCADORES DE PROGNÓSTICO NO ADENOCARCINOMA *IN SITU* DO COLO UTERINO TRATADO DE FORMA CONSERVADORA**, 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, 05 de Setembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 15:25:55.0
RITA MAIRA ZANINE
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
09/09/2024 13:28:07.0
SHELDON RODRIGO BOTOGOSKI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ-
CURITIBA)

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 09:04:50.0
JAN PAWEL ANDRADE PACHNICKI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 14:36:30.0
CAMILA MARCON
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 12:42:35.0
MERI BORDIGNON NOGUEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Rita Maira Zanine, por ter me aceitado como aluna e compartilhado com muita generosidade tanto conhecimento! Obrigada por me ensinar a colocar a “faca na bota” e “fazer a egípcia” quando necessário. Muito obrigada pela disponibilidade e pela enorme gentileza com que guiou meu crescimento nesse período. Que nossos caminhos possam se cruzar por muitas mais vezes.

Aos prof. Dr. Fabio Bastos Russomano, Dra. Cecília Vianna de Andrade, Dra. Giselle Fachetti Machado e Dra. Marise Amaral Rebouças Moreira pelo apoio na obtenção dos casos e discussão dos mesmos.

Ao Maurício Oliveira pela ajuda inestimável na realização da imunohistoquímica

À prof. Dra. Dulcimary Dias Bittencourt pelas muitas vezes que me ajudou com a coleta dos dados em prontuários eletrônicos.

Aos professores e colegas do mestrado, aos funcionários do setor do Arquivo Médico e à Graciele Matia do CEP por me ajudar sempre que a plataforma Brasil parecia um obstáculo intransponível.

À minha família, especialmente minha mãe que sempre me apoiou e me ensinou o lindo caminho do estudo. Ao meu companheiro André e meus filhos Arthur e Rafael por todo apoio e carinho comigo dispensados. À minha irmã, Karina, por sempre estar ao meu lado mesmo estando tão distante fisicamente. Ao Disraeli por nos ensinar diariamente o significado do amor.

RESUMO

O câncer de colo do útero é a segunda neoplasia mais comum na população feminina e aproximadamente 20 a 25% correspondem ao adenocarcinoma, cuja lesão precursora é o adenocarcinoma *in situ* (AIS). O tratamento definitivo do adenocarcinoma *in situ* é a histerectomia, mas por ser uma doença que acomete principalmente mulheres na idade reprodutiva a conização é cada vez mais praticada, sendo sua segurança como método definitivo de tratamento ainda questionada. Os biomarcadores na imunohistoquímica, em particular o p16 e o Ki 67, têm sido estudados como preditores de prognóstico em diferentes tecidos. Essa pesquisa tem por objetivo principal avaliar a utilidade do p16, Ki-67 e da geminina como marcadores de recidiva de lesão em pacientes com AIS submetidas a tratamento conservador (conização). Em um estudo retrospectivo, de corte transversal, realizado em 3 grandes centros de patologia do trato genital inferior no Brasil, no período de agosto de 2007 a maio de 2023, foi avaliada a expressão imuno-histoquímica do p16, Ki 67 e da geminina no produto de conização de mulheres com diagnóstico de AIS e correlacionada a sua expressão com a habilidade de prever recidiva. Como resultados, a imunoexpressão com p16, Ki 67 e geminina não se mostrou útil como marcador de prognóstico no adenocarcinoma *in situ*. Todas as pacientes com recidiva mostraram positividade para p16 e Ki 67 e geminina, enquanto a maioria das pacientes sem recidiva também apresentou positividade para esses marcadores. As margens se mostraram um importante fator de recidiva, principalmente a margem endocervical e os cones de maior volume se mostraram menos associados com a recidiva. Um tempo de seguimento mais longo foi observado no grupo com recidiva. Concluiu-se que o p16, Ki-67 e a geminina não mostraram importância como preditores de prognóstico (100% positividade nas recidivas e no grupo sem recidiva apresentou positividade de 88,89% no p16, 96,30% no Ki67 e 92,59% na geminina, $p=0,999$). As margens comprometidas mostraram-se associadas à maior recidiva, especialmente quando endocervical, mas sem significância estatística (frequência de 66,67%, $p=0,114$). Pela técnica ROSE essa variável ganhou significância estatística (frequência de 100%, $p<0,001$). Cones de menor volume mostraram-se associados à maior risco de recidiva (OR 0,878; IC 95% 0,783-0,960; $p=0,011$). Tempos de seguimento mais longos são imprescindíveis para se fazer o diagnóstico da recidiva (OR=1,160; IC 95% 1,074-1,280; $p<0,001$).

Palavras chaves: Adenocarcinoma *in situ* (AIS), colo do útero, p16, Ki-67, geminina, imunohistoquímica, prognóstico.

ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common neoplasm in the female population and approximately 20 to 25% occur as adenocarcinoma. Adenocarcinoma *in situ* (AIS) is the precursor lesion. The definitive treatment of adenocarcinoma *in situ* is hysterectomy, but as it is a disease that mainly affects women at reproductive age, conization is increasingly practiced. The safety of conization as a definitive method of treatment is still questioned. Immunohistochemistry biomarkers, in particular p16 and Ki67, have been used as predictors of prognosis in many different tissues. The main objective of this research is to evaluate the usefulness of p16, Ki 67 and geminin as markers of recurrence in patients with adenocarcinoma *in situ* undergoing conservative treatment (conization). In a retrospective, cross-sectional study, carried out in three important lower genital pathology centers in Brazil, from August 2007 to May 2023, the immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and geminin in the conization product of women with AIS was evaluated and its expression was correlated with the ability to predict recurrence. As results was verified that the Immunoexpression of p16, Ki-67 and geminin did not prove to be useful as a prognostic marker in adenocarcinoma *in situ*. All recurrences were positive for p16, Ki67 and geminin, while the majority of patients without recurrence also showed positivity for these markers. The margins showed to be an important factor in recurrence, especially the endocervical margin and cones with greater volumes were less related to recurrence. A longer follow up time was observed in the group with recurrence. It was concluded that p16, Ki67 and geminin did not demonstrate importance as prognostic predictors in AIS (100% of positivity in relapses and the group without recurrence showed 88,89% of positivity in p16, 96,30% in Ki67 and 92,59% in geminin, $p=0,999$). Compromised margins were associated with recurrence, especially endocervical margin, but without statistical significance (frequency of 66,67%, $p=0,114$). With the ROSE technique this variable gained statistical significance (frequency of 100%, $p<0,001$). Smaller volume cones were associated with a higher risk of recurrence (OR 0,878; IC95% 0,783-0,960; $p=0,011$). Longer follow up times are essential to observe recurrence (OR=1,160; IC 95% 1,074-1,280; $p<0,001$).

Keywords: Adenocarcinoma *in situ* (AIS), Cervix, p16, Ki67, Geminin, Immunohistochemistry, Prognosis.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- ADENOCARCINOMA *IN SITU* NA CITOLOGIA: CÉLULAS ENDOCERVICAIS COLUNARES ATÍPICAS, COM NÚCLEOS VOLUMOSOS, ALONGADOS E HIPERCROMÁTICOS. ASPECTO TÍPICO EM PLUMAGEM (FEATHERING) E PALIÇADA. MICROGRAFIA COM AUMENTO DE 200X.....25
- FIGURA 2- ADENOCARCINOMA *IN SITU* NA COLPOSCOPIA: EPITÉLIO ACETOBranco EM ZONA DE TRANSFORMAÇÃO.....27
- FIGURA 3 - ADENOCARCINOMA *IN SITU* NA HISTOLOGIA (HE): NÚCLEOS VOLUMOSOS E HIPERCROMÁTICOS E CITOPLASMA ESCASSO. NOTA-SE À ESQUERDA EPITÉLIO GLANDULAR NORMAL.MICROFOTOGRAFIA COM AUMENTO DE 400X.27
- FIGURA 4 - EXPRESSÃO FORTE E DIFUSA DO P16 EM NÚCLEO E CITOPLASMA NO TECIDO DE ADENOCARCINOMA *IN SITU* CONTRASTANDO COM A GLÂNDULA NORMAL ADJACENTE44
- FIGURA 5 - EPITÉLIO GLANDULAR NORMAL COM POSITIVIDADE FRACA E IRREGULAR DO P16.....44
- FIGURA 6 - METAPLASIA TUBO ENDOMETRIAL COM POSITIVIDADE FRACA E IRREGULAR DO P16.....45
- FIGURA 7- IMUNOEXPRESSÃO DO KI 67 NO ADENOCARCINOMA *IN SITU*46
- FIGURA 8 - ADENOCARCINOMA *IN SITU* NA HISTOLOGIA (HE): NÚCLEOS VOLUMOSOS E HIPERCROMÁTICOS COM CITOPLASMA ESCASSO. PRÓXIMO À BARRA DE TAMANHO HÁ UMA MITOSE. MICROFOTOGRAFIA COM AUMENTO DE 400X.....53
- FIGURA 9 - IMUNOHISTOQUÍMICA COM P16 EM TECIDO GLANDULAR NORMAL (FIGURA a) E NO ADENOCARCINOMA *IN SITU* (FIGURA b). PODEMOS OBSERVAR A AUSÊNCIA DA IMUNOMARCAÇÃO NA GLÂNDULA NORMAL E MARCAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA FORTE E DIFUSA (COLORAÇÃO MARROM) NO ADENOCARCINOMA *IN SITU*. MICROFOTOGRAFIA COM AUMENTO DE 400X.....56
- FIGURA 10 - VISÃO PANORÂMICA DO EPITÉLIO GLANDULAR NORMAL E O ADENOCARCINOMA *IN SITU* (COLORAÇÃO MARROM) NA IMUNOHISTOQUÍMICA COM P1657
- FIGURA 11. IMUNOHISTOQUÍMICA COM KI 67 EM TECIDO GLANDULAR NORMAL (FIGURA a) E NO ADENOCARCINOMA *IN SITU* (FIGURA b). PODEMOS OBSERVAR A AUSÊNCIA DA IMUNOMARCAÇÃO NA GLÂNDULA NORMAL E MARCAÇÃO NUCLEAR (COLORAÇÃO

MARROM) NO ADENOCARCINOMA <i>IN SITU</i> . MICROFOTOGRAFIA COM AUMENTO DE 400X.....	57
FIGURA 12 - VISÃO PANORÂMICA DO EPITÉLIO GLANDULAR NORMAL E O ADENOCARCINOMA <i>IN SITU</i> (COLORAÇÃO MARROM) NA IMUNOHISTOQUÍMICA COM KI 67. PODEMOS OBSERVAR À ESQUERDA A MARCAÇÃO DO EPITÉLIO BASAL ESCAMOSO TAMBÉM.....	58
FIGURA 13 - IMUNOHISTOQUÍMICA COM GEMININA EM TECIDO <i>GLANDULAR</i> NORMAL (FIGURA a) E NO ADENOCARCINOMA <i>IN SITU</i> (FIGURA b). PODEMOS OBSERVAR A PRESENÇA DA IMUNOMARCAÇÃO NUCLEAR TANTO NA GLÂNDULA NORMAL COMO NO ADENOCARCINOMA <i>IN SITU</i> (COLORAÇÃO MARROM). MICROFOTOGRAFIA COM AUMENTO DE 400X.....	58
FIGURA 14 - VISÃO PANORÂMICA DO EPITÉLIO GLANDULAR NORMAL E O ADENOCARCINOMA <i>IN SITU</i> (COLORAÇÃO MARROM) NA IMUNOHISTOQUÍMICA. COM GEMININA.	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADOS DESCRITIVOS DAS VARIÁVEIS QUANTITATIVAS DA AMOSTRA.....	54
TABELA 2 - RESULTADOS DESCRITIVOS DAS VARIÁVEIS CATEGÓRICAS DA AMOSTRA (CONTINUA).	54
TABELA 3 - RESULTADO DA ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS BIOMARCADORES P16, KI 67 E GEMININA E RECIDIVA DA DOENÇA	59
TABELA 3.1 RESULTADO DA ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS BIOMARCADORES P16, KI 67 E GEMININA E RECIDIVA DA DOENÇA ATRAVÉS DA TÉCNICA ROSE.	60
TABELA 4 - A CORRELAÇÃO ENTRE O COMPROMETIMENTO DAS MARGENS DA PEÇA DO CONE E A RECIDIVA DA DOENÇA	61
TABELA 4.1- A CORRELAÇÃO ENTRE O COMPROMETIMENTO DAS MARGENS DA PEÇA DO CONE E A RECIDIVA DA DOENÇA ATRAVÉS DA TÉCNICA ROSE	61
TABELA 5 - IDADE, VOLUME DO CONE, TEMPO DE SEGUIMENTO E RISCO DE RECIDIVA	62
TABELA 5.1- IDADE, VOLUME DO CONE, TEMPO DE SEGUIMENTO E RISCO DE RECIDIVA ATRAVÉS DA TÉCNICA ROSE	62
TABELA 6 - REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA PARA O DESFECHO RECIDIVA	63

LISTA DE SIGLAS

AIS	- Adenocarcinoma <i>in situ</i>
AGC	- Atipia glandular cervical
ASCCP-	- <i>American Society for Colposcopy and Cervical Pathology</i>
ASC-US grau	- Atipia escamosa de significado indeterminado, provavelmente baixo grau
ASC-H grau	- Atipia escamosa de significado indeterminado, provavelmente alto grau
CAF	- Cirurgia de alta frequência
CDK	- Quinases ciclino dependentes
CDKi	- Inibidores das quinases ciclino dependentes
CEC-	- Carcinoma escamo celular
Diag	- Diagnóstico
DIU	- Dispositivo Intrauterino
Ecto	- Ectocervical
Endo	- Endocervical
ER+	- Receptor Estrogênio positivo
ECC	- Curetagem Endocervical
EZT	- Excisão da zona de transformação
GMN	- Geminina
HE	- Hematoxilina Eosina
HPV	- Papilomavírus humano

HPV HR	- Papilomavírus humano de alto risco
HSV-2	- Herpes simples vírus tipo 2
HT	- Histerectomia
IECC	- <i>International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification</i>
IFCPC	- Federação internacional de colposcopia e patologia cervical
JEC	- Junção Escamo-Colunar
LAST	- <i>Lower Anogenital Squamous Terminology</i>
LSIL	- Lesão intraepitelial de baixo grau
HSIL	- Lesão intraepitelial de alto grau
MCM	- <i>Minichromosome Maintenance complex</i>
Mm	- milímetro
NIC 1	- Neoplasia Intraepitelial cervical grau 1
NIC 2	- Neoplasia Intraepitelial cervical grau 2
NIC 3	- Neoplasia Intraepitelial cervical grau 3
OMS	- Organização mundial da saúde
pRb	- Proteína retinoblastoma
QT	- Quimioterapia
ROSE	- <i>Random over sampling examples</i>
RPMO	- Rotura prematura das membranas ovulares
RT	- Radioterapia
seg	- Seguimento
SICPCV	- <i>Italian Society of Colposcopy and Cervical Pathology</i>
SOGC	- Sociedade de Obstetrícia e Ginecologia do Canadá
SWETZ	- <i>Straight Wire Excision of the Transformation Zone</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	OBJETIVO GERAL	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4	REFERENCIAL TEÓRICO	19
4.1	ETIOLOGIA DO ADENOCARCINOMA <i>IN SITU</i> E COFADORES.....	19
4.2	BIOMARCADORES E CICLO CELULAR.....	20
4.3	DIAGNÓSTICO DO ADENOCARCINOMA <i>IN SITU</i> E ADENOCARCINOMA	23
4.3.1	Papel da citologia no diagnóstico do AIS/ adenocarcinoma	23
4.3.2	Papel da colposcopia e histopatologia no diagnóstico do AIS/adenocarcinoma	25
4.3.3	Papel dos biomarcadores no diagnóstico do AIS/adenocarcinoma.....	28
4.3.4	Papel do HPV no diagnóstico do AIS/ adenocarcinoma	30
4.4	TRATAMENTO DO AIS	30
4.5	SEGUIMENTO APÓS TRATAMENTO CONSERVADOR COM AIS.....	30
4.6	FATORES CLÍNICOS E TESTAGEM DO HPV COMO PREDITORES DE PROGNÓSTICO	34
4.7	BIOMARCADORES COMO FATORES DE PROGNÓSTICO	35
4.7.1	p16 E Ki 67	35
4.7.2	GEMININA.....	37
5	HIPÓTESE.....	40
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
6.1	SELEÇÃO DOS CASOS.....	41
6.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	41
6.2.1	Critérios de inclusão	41

6.2.2 Critérios de exclusão	41
6.3 REVISÃO HISTOPATOLÓGICA:.....	42
6.4 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	42
6.4.1 Técnica da imunohistoquímica	42
6.4.2 Avaliação das marcações imuno-histoquímicas	43
6.5 REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS MÉDICOS	47
6.5.1 Dados demográficos e sociais: idade ao diagnóstico, tabagismo, paridade.	47
6.5.2 Citologia de encaminhamento	47
6.5.3 Colposcopia.....	48
6.5.4 Resultado da biópsia durante colposcopia	48
6.5.5 Técnica cirúrgica realizada	48
6.5.6 Margens cirúrgicas	48
6.5.7 Volume do cone.....	48
6.5.8 Seguimento pós cirurgia	49
7 ASPECTOS ÉTICOS	50
8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
9 RESULTADOS	52
10 DISCUSSÃO.....	64
11 CONCLUSÕES.....	71
12 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO 1- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	81
ANEXO 2- CEP UFPR	84
ANEXO 3 - CEP IFF.....	88
ANEXO 4- ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NA ANNALS OF DIAGNOSTIC PATHOLOGY.....	96

1 INTRODUÇÃO

ADENOCARCINOMA *IN SITU*

O Adenocarcinoma *in situ* (AIS) foi descrito pela primeira vez em 1952 por Hepler *et al.* e é reconhecido como lesão precursora do adenocarcinoma. Enquanto a incidência do carcinoma escamoso de colo vem diminuindo, devido aos programas organizados de rastreamento que permitem o diagnóstico precoce das lesões precursoras e o tratamento das mesmas, a proporção relativa e a incidência absoluta do adenocarcinoma de colo aumentaram consideravelmente nos últimos anos. Nas décadas de 1960 e 1970 compreendia 5-10% dos cânceres de colo e atualmente representa 20 a 25% dos casos de câncer de colo (COSTA *et al.*,2011).

Uma das principais razões é que o diagnóstico das lesões glandulares apresenta limitações. A citologia oncótica tem uma menor sensibilidade pois além de não apresentar critérios citomorfológicos bem definidos para a interpretação das lesões glandulares, a localização das mesmas dentro do canal endocervical ou dentro das glândulas a torna menos acessível para uma amostra adequada (COSTA *et al.*, 2015; LASHMANOVA *et al.*, 2022). Pelas mesmas razões a colposcopia também é pouco elucidativa, com achados pouco específicos. Estes aspectos se configuram como obstáculos no diagnóstico do AIS fazendo com que esses exames tenham um papel menos definido na detecção de lesões precursoras glandulares e na diferenciação das lesões precursoras e invasoras.

A infecção persistente pelo HPV de alto risco é reconhecidamente o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo. Devido às dificuldades diagnósticas já mencionadas, a avaliação do HPV tem se mostrado particularmente importante na doença glandular de colo. Estudos revelam que a triagem com HPV aumenta o valor preditivo e a sensibilidade do diagnóstico de doença glandular, sendo os subtipos HPV16 e HPV18 os mais frequentemente identificados (TEOH *et al.*,2020; LASHMANOVA *et al.*, 2022). O HPV18 está presente em 38 a 50% dos diagnósticos de AIS e é associado a um risco aumentado de adenocarcinoma de colo, particularmente com um curso mais agressivo (TEOH *et al.*,2020; BELKIC *et al.*, 2022). O HPV 16-18 é utilizado como teste de rastreio em alguns programas em

países desenvolvidos e em co-teste no seguimento de mulheres tratadas de AIS por conização. Apesar de importante ferramenta o HPV tem uma baixa especificidade já que não pode diferenciar infecção transitória de persistente.

O uso de biomarcadores também vem auxiliando no diagnóstico das lesões glandulares. Nas lesões escamosas seu uso já é bem estabelecido no critério LAST, onde auxilia na definição das displasias moderadas com potencial de progressão e nas LSIL com maior probabilidade de transformação em lesão de alto grau. Já nas lesões glandulares é útil no diagnóstico diferencial das patologias benignas que mimetizam morfológicamente o adenocarcinoma, particularmente a metaplasia tubária. A expressão do p16 no AIS e adenocarcinoma se apresenta como forte e difusa. A sua expressão na metaplasia tubária é fraca e irregular. O Ki 67 também apresenta um padrão de positividade distinto nos tecidos neoplásicos. A geminina ainda é pouco estudada no colo uterino. Deve-se salientar que a imunohistoquímica é ferramenta de complementação diagnóstica. O critério morfológico continua sendo o padrão ouro (PANICKER *et al.*,2021)

O tratamento definitivo do AIS é a histerectomia. Como a maioria das pacientes têm ao diagnóstico uma média de idade de 30 a 40 anos e grande parte não completou seu desejo reprodutivo, impõe-se então uma abordagem mais conservadora em termos de tratamento (TAVARES, 2015). A conização tem sido adotada como alternativa à histerectomia, mas é necessária uma estratégia eficaz que permita a detecção precoce de doença persistente, recorrente ou progressiva. Em 15% dos casos estão presentes as “skip lesions” (lesões saltadoras) e mesmo as margens cirúrgicas negativas para doença não tem o mesmo significado que nas lesões escamosas. Os biomarcadores entram neste cenário como ferramentas promissoras tanto no auxílio do diagnóstico das lesões glandulares como no auxílio da identificação das lesões significativas e com potencial de progressão, permitindo um tratamento mais personalizado para as mulheres diagnosticadas com adenocarcinoma *in situ* do colo uterino (WARD *et al.*,2002)

Neste estudo pretende-se avaliar se as variáveis volume do cone, comprometimento de margens do cone e imunoexpressão para p16, Ki 67 e geminina atuam como fatores de risco para recidiva do AIS tratado de forma conservadora.

2 JUSTIFICATIVA

A proporção relativa e a incidência absoluta do adenocarcinoma de colo aumentaram consideravelmente nos últimos anos mostrando uma falha no rastreamento de sua lesão precursora: o adenocarcinoma *in situ*. A citologia e a colposcopia não apresentam a mesma eficácia nas doenças glandulares e escamosas. Além das dificuldades no diagnóstico, o tratamento também é controverso. Por se tratar de doença multifocal em até 15% dos casos a histerectomia é considerada o tratamento definitivo.

Como o AIS acomete mulheres jovens, em idade reprodutiva, o tratamento conservador com conização tem sido adotado como alternativa à histerectomia, mas é necessária uma estratégia eficaz que permita estratificar as pacientes e seus diferentes riscos prognósticos. Os biomarcadores vêm sendo estudados como preditores prognósticos de doença e em conjunto com outras variáveis já conhecidas como idade e comprometimento de margens podem ser úteis estratificando risco e permitindo um tratamento mais personalizado para mulheres diagnosticadas com adenocarcinoma *in situ*.

A identificação de biomarcadores no adenocarcinoma *in situ* pode auxiliar na estratificação de pacientes com maior ou menor risco de recidiva, auxiliando na decisão de tratamentos mais conservadores.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar a expressão das proteínas p16, Ki-67 e geminina nas peças de conização de pacientes tratadas de adenocarcinoma *in situ* de colo uterino e correlacionar sua capacidade de predizer recidiva de doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a correlação entre citologia de encaminhamento, biópsia e achados colposcópicos com diagnóstico final de AIS;
- Avaliar o comprometimento das margens do cone como preditor de recidiva de doença;
- Avaliar a correlação da idade, tempo de seguimento e volume do cone com a recidiva.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 ETIOLOGIA DO ADENOCARCINOMA *IN SITU* E COFADORES

O adenocarcinoma *in situ* é a lesão precursora do adenocarcinoma e, assim como na doença escamosa, a relação entre a infecção pelo HPV de alto risco e o adenocarcinoma é causal (CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2006) na maioria dos casos. Os subtipos 16 e 18 são os mais prevalentes, especialmente o HPV 18 que está associado com 38 a 50% dos diagnósticos de AIS (LASHMANOVA *et al.*, 2022). Cofatores como baixa escolaridade, higiene precária, uso prolongado de contraceptivo hormonal, promiscuidade e infecção pelo HSV-2 em pacientes infectadas pelo HPV de alto grau parecem também apresentar uma forte associação com desenvolvimento do adenocarcinoma, enquanto uso do DIU se mostra um cofator de proteção (CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2006).

O adenocarcinoma *in situ* HPV associado geralmente se inicia próximo ou dentro da junção escamo-colunar em pacientes com uma média de idade de 40 anos, é assintomático e, como previamente descrito, de difícil diagnóstico citológico e colposcópico. É causado pela infecção persistente com o HPV de alto risco, principalmente os tipos 16 e 18 e menos comumente os tipos 35 e 45 (STOLNICU *et al.*, 2020). Geralmente envolve a superfície do epitélio glandular e o epitélio das criptas subjacentes e muito comumente é associado a doença escamosa. A presença das “skip lesions” (lesões saltadoras) e a extensão alta no canal endocervical não são comuns, por vezes a secção tangencial pode dar a impressão de uma lesão saltadora (STOLNICU *et al.*, 2020).

O conhecimento do HPV como agente necessário para o desenvolvimento do adenocarcinoma é de extrema importância pois implica que a imunização contra o HPV e o uso do teste de HPV em programas de rastreamento primários auxiliem na detecção das lesões precursoras com conseqüente diminuição da incidência do adenocarcinoma (CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2006), no entanto, o adenocarcinoma abrange um grupo heterogêneo de tumores e cerca de 15% a 20% não são relacionados à infecção pelo HPV (GIANNELLA *et al.*, 2022; STOLNICU *et al.*, 2020).

A classificação do IECC- 2018 criou as bases para a atualização da OMS sobre os tumores da genitália feminina (STOLNICU *et al.*, 2020; McCLUGGAGE *et al.*, 2022), onde há a subdivisão do adenocarcinoma cervical em HPV-associado (tipo usual, viloglandular, mucinoso, mucinoso-intestinal, estratificado invasivo produtor de mucina, micropapilar e seroso) e HPV independente (tipo gástrico, células claras, mesonéfrico e endometrióide). Assim como das lesões precursoras: AIS HPV associado e HPV independente. Essa nova classificação sugere o uso da imuno histoquímica com p16 para indicar a presença do HPV e define que os adenocarcinomas HPV associados quase sempre apresentam imunorreatividade forte e difusa para p16, embora ocasionalmente ocorra perda total ou focal do p16 durante a progressão do tumor, possivelmente secundário à deleção ou metilação (MOLIJN *et al.*, 2016).

Os adenocarcinomas HPV independentes são quase sempre p16 negativos ou apresentam reatividade focal (McCLUGGAGE *et al.*, 2022). A lesão precursora do adenocarcinoma HPV dependente é o AIS usual e a lesão intraepitelial estratificada produtora de mucina (SMILE) enquanto as lesões precursoras dos adenocarcinomas HPV independentes são mais incomuns e pior definidas (McCLUGGAGE *et al.*, 2022). Os adenocarcinomas HPV independentes tipicamente se apresentam em um estágio mais avançado e têm um pior prognóstico (GIANNELLA *et al.*, 2022; STOLNICU *et al.*, 2020; McCLUGGAGE *et al.*, 2022).

4.2 BIOMARCADORES E CICLO CELULAR

O desenvolvimento da neoplasia está associado a anormalidades no controle do ciclo celular e nos mecanismos de apoptose. O ciclo celular é o conjunto de fases pelo qual a célula passa da sua origem à duplicação e em diferentes pontos deste ciclo atuam as proteínas reguladoras. Essa sequência de fases, com seus respectivos *checkpoints*, permite que a célula complete seu ciclo normal e mantenha a integridade do seu genoma (WARD *et al.*, 2002). O maior desafio na replicação do DNA é que o genoma inteiro deve ser duplicado precisamente, uma vez por ciclo (GONZALEZ *et al.*, 2004).

A progressão através do ciclo celular é controlada por proteínas chamadas CDKs (quinases ciclino dependentes) e sua inibição é controlada por inibidores de CDKs (CDKis). Os proto-oncogenes são proteínas que estimulam a divisão celular e os genes supressores de tumor são proteínas que bloqueiam o ciclo. Mutações nesses genes levam à perda dos mecanismos de controle do ciclo celular normal (WARD *et al.*, 2002).

A iniciação da replicação do DNA envolve a interação de um complexo de proteínas na origem da replicação (OR). Esse processo é conhecido como licenciamento. As proteínas cdc6 e cdt1 se ligam à origem da replicação e recrutam o MCM2-7 formando um complexo pré- reconhecimento. Esse complexo pré ativado inicia a síntese do DNA (LODDO *et al.*, 2009)

O p16, Ki 67 e a geminina são proteínas com atuações distintas no ciclo celular. São biomarcadores usados como ferramentas complementares nos diagnósticos duvidosos, marcadores de prognóstico e de definição da melhor terapêutica nos casos de câncer. Através do entendimento do mecanismo de ação desses genes envolvidos na gênese tumoral, é possível a intervenção desativando processos de oncogênese, induzindo células defeituosas a apoptose e prevenindo proliferação e metástase (WARD *et al.*, 2002).

Esses marcadores são avaliados através no processo de imunohistoquímica ou imunocitoquímica, cujo princípio básico é o uso de anticorpos específicos que se ligam a antígenos específicos presentes no tecido biológico. A visualização dessa reação antígeno anticorpo se dá pelo uso de um detector cromogênico que é uma enzima conjugada ao anticorpo que subsequentemente cliva um substrato para produzir um precipitado colorido. Esse processo se chama imunomarcacão (PANICKER *et al.*, 2008).

O p16 é um inibidor de CDK, ele regula a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Sua principal função é a inibição das ciclinas dependentes de quinase (CDK4 e CDK6) que são necessárias para fosforilar a proteína retinoblastoma (pRb). Quando há uma infecção pelo HPV, o oncogene E7 do vírus se liga à pRb do hospedeiro levando a uma rápida progressão do ciclo celular com perda do controle da integridade do DNA. Isso libera a produção do p16 de seu controle de *feedback*

negativo com aumento em seus níveis nas células, numa tentativa de inibir essa proliferação descontrolada. Assim sendo, a expressão anormal do p16 é um marcador da inativação do pRb mediada pela oncoproteína E7 e pode ser usado como um indicador de HPV de alto risco com potencial transformador (SINGH *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2017). O p16 indica muito mais do que a presença do HPV de alto risco, o vírus pode estar presente sem nenhuma consequência. O p16 é um marcador sensível e específico de lesões transformantes.

O Ki67 é uma proteína nuclear, considerada um marcador de proliferação celular e é expressa em várias fases da divisão celular. Ela reflete a proliferação celular e replicação do DNA e tem sido extensamente estudada como biomarcador em diferentes tipos de câncer, como mama e pulmão. Sua expressão no epitélio escamoso do colo normal, por exemplo, é restrita às camadas basais que estão em constante renovação. Nessas camadas sempre existem células em mitose, com marcação para Ki-67. Quando essa marcação é detectada em outras camadas do epitélio, sugere-se que há uma desregulação do ciclo celular (TU *et al.*, 2021)

A replicação do DNA se inicia em diferentes sítios do cromossoma através da ação coordenada de fatores de iniciação da replicação, uma mesma origem não pode ser ativada mais do que uma vez em um ciclo celular. A geminina é uma proteína do ciclo celular que coordena esse processo de inibição de uma nova replicação através de sua ligação com o fator de iniciação da replicação do DNA, o cdt1p (WOHLSCHEGEL *et al.*, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2004).

Ela se liga ao cdt1p do complexo pré reconhecimento e assim permanece até que o DNA seja replicado, prevenindo o recrutamento do complexo MCM nas fases S-G2 e M do ciclo. Sua expressão começa quando a origem é acionada na transição G1-S e aumenta ao longo do ciclo, atingindo seu máximo na mitose quando é degradada permitindo que um novo ciclo de replicação do DNA se inicie. Para que esse processo funcione de modo adequado tem que haver um balanço entre a geminina e o cdt 1. O desequilíbrio destas proteínas predispõe a transformações malignas (PETROPOULOU *et al.*, 2008). Por refletir a proliferação celular, a geminina passou a ser estudada como um potencial marcador de neoplasias.

Os mecanismos moleculares de replicação do DNA não são completamente compreendidos, o que é bem estabelecido é que as células têm uma rede de mecanismos e caminhos sinalizados para monitorar e lidar com a integridade genômica.

A importância do p16 e Ki 67 em lesões escamosas já está bem estabelecida, mas são poucos os estudos em doença glandular, por isso foram os marcadores escolhidos. A geminina tem se mostrado uma importante ferramenta de diagnóstico e prognóstico em tecidos como mama, cabeça e pescoço, pulmonar e no trato gastro intestinal, mas os estudos em colo uterino ainda são escassos, os poucos existentes são em lesão intraepitelial escamosa, por isso foi um marcador escolhido.

4.3 DIAGNÓSTICO DO AIS E ADENOCARCINOMA

4.3.1 Papel da citologia no diagnóstico do AIS/ adenocarcinoma

O diagnóstico citológico das doenças glandulares só foi introduzido em 1988 com a classificação do Sistema Bethesda, quando se criou a categoria diagnóstica AGUS- células glandulares atípicas de significado indeterminado. As atipias glandulares são definidas como células com alterações nucleares que excedem os processos reacionais/ reparativos, mas que não apresentam anaplasia característica de adenocarcinoma. Em 1991, na primeira revisão do sistema Bethesda, houve a subclassificação em AGUS favorecendo processo reativo (AGUS-FR) e AGUS favorecendo processo neoplásico (AGUS-FN). Em 2001 esse termo foi substituído por ACG- Células Glandulares Atípicas, sendo indicado o sítio de origem (cervical ou endometrial) e sub classificado em células glandulares atípicas sem outras especificações (AGC-SOE), células glandulares atípicas favorecendo neoplasia (AGC- FN) e adenocarcinoma *in situ* (AIS). Essas alterações na terminologia objetivaram aumentar a detecção de doenças significativas nas anormalidades glandulares em citologia (WESTIN *et al.*, 2008).

Em 2006, a nomenclatura brasileira para laudos cervicais- INCA, estabeleceu as categorias: células glandulares atípicas de significado indeterminado,

possivelmente não neoplásicas e em que não se pode excluir lesão intraepitelial de alto grau, análogas às categorias de células glandulares atípicas sem outra especificação e favorecendo neoplasia, usadas no Sistema Bethesda (INCA, 2011).

A partir de 2020 a OMS adotou as definições: AIS- HPV associado e AIS-não HPV associado. Diante de uma lesão glandular cervical não invasiva, onde as características morfológicas são de uma lesão pré-maligna HPV- associada, o diagnóstico de AIS deve ser feito quando presente uma imunomarcagem forte e difusa para HPV (STOLNICU *et al.*, 2020). Os termos atipia glandular e displasia glandular não são mais usados pois usam critérios morfológicos pouco definidos e apresentam grandes variações de diagnóstico interobservador e de evolução para adenocarcinoma.

Questionamentos vêm sendo levantados sobre o uso do mesmo processo de rastreio para lesões escamosas e glandulares (SOARES *et al.*, 2016). O rastreio citológico do adenocarcinoma é menos eficaz que o rastreio do carcinoma escamoso. Erros de amostragem e/ou erros de interpretação são responsáveis por essa diferença. Os erros de amostragem ocorrem por celularidade escassa ou mesmo ausência de células representativas da lesão, isso porque as lesões muitas vezes se encontram dentro do canal e o fundo das glândulas é mais envolvido que a superfície. Os erros de interpretação ocorrem porque a doença glandular carece de critérios cito morfológicos bem definidos para sua interpretação e são menos frequentes, sendo assim menos conhecidas. Um estudo com 74 pacientes de adenocarcinoma *in situ*, encontrou um diagnóstico citológico definitivo de AIS em apenas 10% dos casos, enquanto 54% das alterações citológicas eram relacionadas às células escamosas (LASHMANOVA *et al.*, 2022). A citologia também não consegue distinguir de forma precisa entre a lesão *in situ* e a lesão invasora, o que só pode ser confirmado pela histologia (MARQUES *et al.*, 2010; WESTIN *et al.*, 2008).

Usando dados de triagem cervical registrados prospectivamente, Castanon *et al.* (2016) observaram que o rastreio citológico não se mostrou associado a um aumento no diagnóstico de lesão precursora glandular, mas sim a uma menor chance de adenocarcinoma avançado, sugerindo que o rastreio citológico é ineficiente na prevenção do adenocarcinoma, mas eficiente no diagnóstico precoce da lesão

invasiva. Já na doença escamosa a citologia é eficiente no diagnóstico da lesão precursora (CASTANON *et al.*, 2016).

Achados citológicos de AGC, lesão intraepitelial escamosa ou mesmo citologias normais são frequentemente encontrados ao adenocarcinoma *in situ* (LASHMANOVA *et al.*, 2022). A citologia AGC é de grande importância pela alta frequência de associação com alterações neoplásicas, o que justifica que todo AGC deva ser avaliado com colposcopia e citologia endocervical (TEOH *et al.*, 2020; MARQUES *et al.*, 2010; WESTIN *et al.*, 2008). Achados benignos como pólipos endometriais e cervicais, adenose vaginal, processos inflamatórios e alterações reativas também são muitas vezes descritos como AGC (INCA, 2011). Quando a citologia é descritiva de adenocarcinoma *in situ* há a confirmação histológica da lesão em 48% a 69% das mulheres e dessas, 38% apresentam invasão (INCA, 2011)

FIGURA 1- ADENOCARCINOMA *IN SITU* NA CITOLOGIA: CÉLULAS ENDOCERVICAIS COLUNARES ATÍPICAS, COM NÚCLEOS VOLUMOSOS, ALONGADOS E HIPERCROMÁTICOS. ASPECTO TÍPICO EM PLUMAGEM (FEATHERING) E PALIÇADA.



MICROGRAFIA COM AUMENTO DE 200x. FONTE: IARC- Atlas Digital.

4.3.2 Papel da colposcopia e Histopatologia no diagnóstico do AIS/adenocarcinoma

A colposcopia é indicada para todas as pacientes com citologia AGC ou AIS. Seu objetivo é confirmar ou refutar a suspeita citológica de neoplasia intraepitelial ou

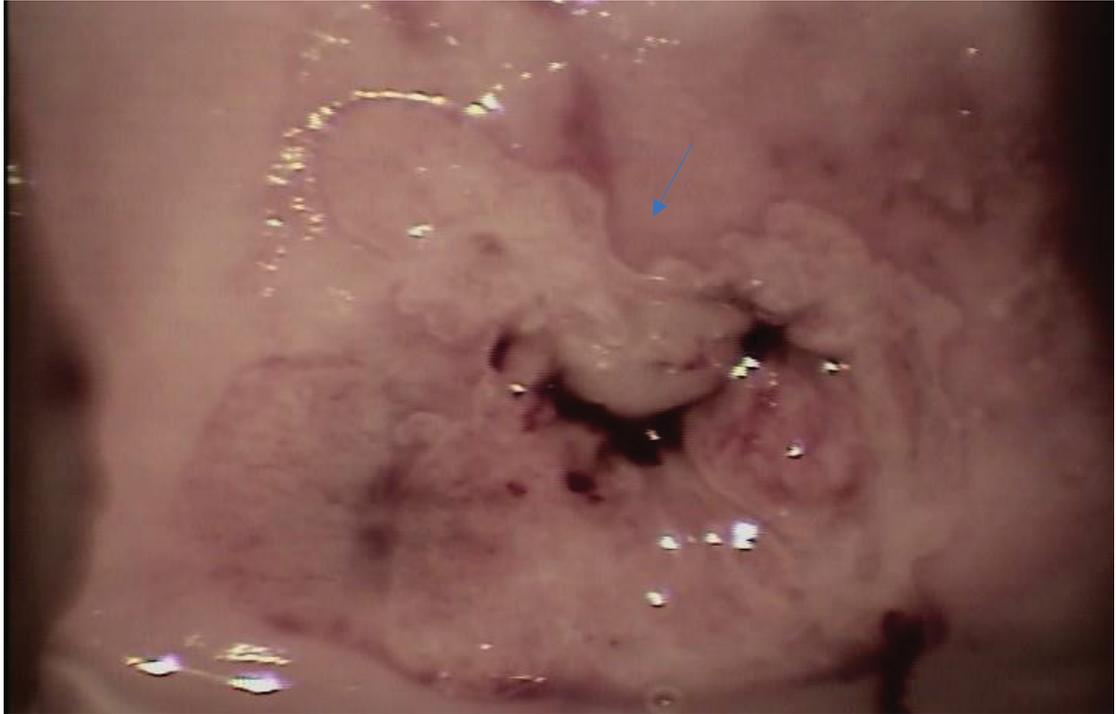
câncer e através de biópsia e do estudo anatomopatológico definir a terapêutica (JORDAN *et al.*, 2010). Apesar de ser um exame com alta sensibilidade possui baixa especificidade, pois nem todo epitélio acetobranco significa anormalidade e, por ser um exame observador dependente, também tem sua acurácia superestimada.

A colposcopia tem um papel mais bem definido nas lesões escamosas. Os colposcopistas são treinados para reconhecer padrões de alterações associados ao epitélio escamoso. A própria terminologia colposcópica do colo uterino definida pela Federação Internacional de Patologia do Colo e Colposcopia (IFCPC), em 2011, não inclui parâmetros relacionados à neoplasia cervical glandular (MACHADO *et al.*, 2022; DUBUC-LISSOIR *et al.*, 1999; BORNSTEIN *et al.*, 2012).

As lesões glandulares, além de não apresentarem imagens colposcópicas bem definidas, podem ser invisíveis aos colposcopistas pois podem ocorrer na porção proximal do endocérvice e na profundidade das criptas. A ausência de estudos sobre a performance colposcópica no diagnóstico de lesões precursoras glandulares também é uma realidade.

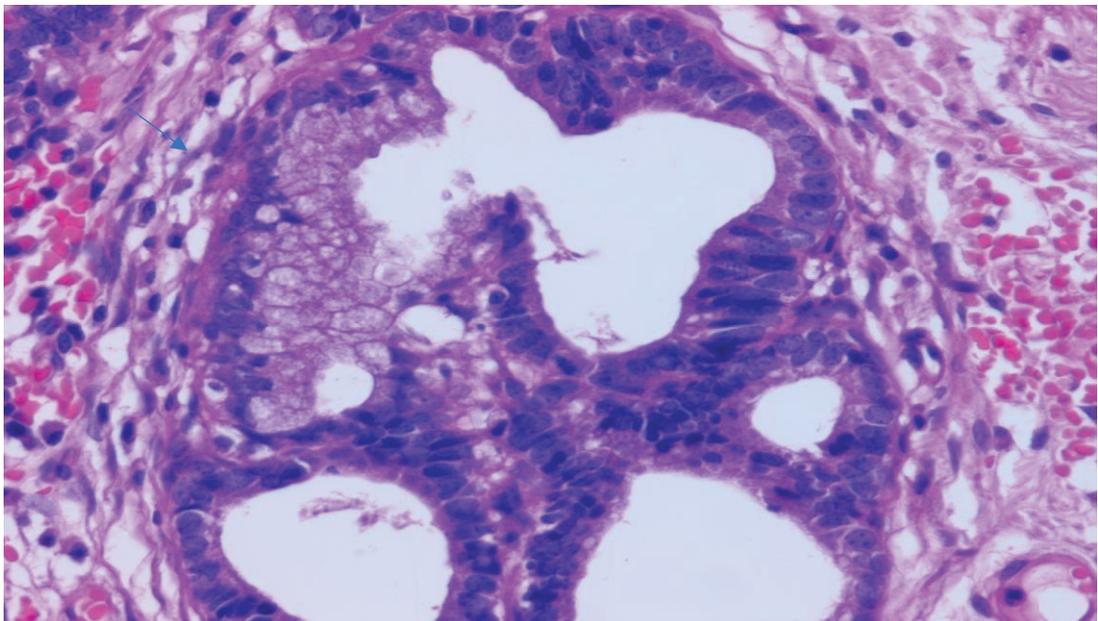
A SOGC, em uma diretriz de 1999, sugeriu algumas imagens colposcópicas sugestivas de lesão glandular: lesões elevadas em cima do epitélio colunar, lesões com largas aberturas de glândulas, fusão de vilos, lesões papilares e atípicas vasculares. As formações vasculares do tipo pontilhado, mosaico e saca-rolhas não são vistas nas lesões glandulares (DUBUC-LISSOIR *et al.*, 1999).

Machado *et al.* (2022) evidenciaram que três imagens colposcópicas se mostraram mais prevalentes no adenocarcinoma *in situ*: glândulas agrupadas e espessadas, vilos aceto-brancos e vasos atípicos em epitélio cilíndrico. A performance diagnóstica delas foi avaliada através da análise de sensibilidade, especificidade e acurácia. A presença dessas lesões aumentou a acurácia do diagnóstico de AIS e a sensibilidade se mostrou inferior à especificidade mostrando que na ausência dessas imagens o AIS é encontrado com frequência (falso negativos), enquanto na presença das mesmas é alto o diagnóstico do AIS. O estudo sugere que o treinamento de colposcopistas no reconhecimento dessas imagens possa melhorar a performance diagnóstica da colposcopia no AIS.

FIGURA 2- ADENOCARCINOMA *IN SITU* NA COLPOSCOPIA

EPITÉLIO ACETOBranco EM ZONA DE TRANSFORMAÇÃO (seta)

FONTE: Dra. Giselle Fachetti (2024)

FIGURA 3 - ADENOCARCINOMA *IN SITU* NA HISTOLOGIA (HE):. NÚCLEOS VOLUMOSOS E HIPERCROMÁTICOS E CITOPLASMA ESCASSO

MICROFOTOGRAFIA COM AUMENTO DE 400X.

NOTA-SE A ESQUERDA EPITÉLIO GLANDULAR NORMAL (SETA)

FONTE: Patrícia Pereira Pinto (2024)

4.3.3 Papel dos biomarcadores no diagnóstico do AIS/adenocarcinoma

A importância do p16 como ferramenta de auxílio diagnóstico nas lesões intraepiteliais escamosas já é bem estabelecida. Baseado nas recomendações da diretriz LAST na prática clínica, seu uso é recomendado em lesões escamosas para diferenciar entre lesões de alto grau e lesões benignas que mimetizam neoplasia; no auxílio diagnóstico das lesões de alto grau, nas lesões de NIC 2, nos casos em que não há consenso profissional ou em casos cuja citologia sugere alto grau e não há correspondência colposcópica /histológica (CLINTON *et al.*, 2015). As recomendações da diretriz LAST não incluem as lesões glandulares.

Os estudos que mostram a importância do p16 nas lesões glandulares do colo ainda trazem resultados conflitantes, isso porque somente em 2018 a Associação Britânica de Patologistas em Ginecologia padronizou sua interpretação (SINGH *et al.*, 2018). Alguns estudos questionam seu valor no epitélio glandular pois existem neoplasias benignas mimetizadoras de doença glandular, especialmente a metaplasia tubária, que também apresentam positividade para o p16, mas um padrão fraco e irregular, diferente do padrão forte e difuso da neoplasia glandular. Em uma revisão sobre a importância do p16 e Ki 67 no diagnóstico de lesões glandulares cervicais, Pinto *et al.* (2023) observaram que o p16 se mostrou ferramenta de complementação diagnóstica importante quando a interpretação desse marcador se baseia no padrão de positividade.

Atualmente, a OMS subdividiu a lesão de AIS em HPV associado e HPV não associado e definiu que a imunorreatividade nuclear e citoplasmática forte e difusa com p16 define o AIS-HPV associado (STOLNICU *et al.*, 2020). O p16 é negativo ou expresso focalmente no epitélio glandular cervical normal ou nas lesões glandulares que mimetizam neoplasia (STOLNICU *et al.*, 2020).

O Ki67 foi um dos primeiros marcadores usados para melhor definir as lesões glandulares. Estudos mostram que a sua expressão aumenta de acordo com a gravidade da lesão (NEGRI *et al.*, 2011). O índice de proliferação do Ki67 é alto (mais de 30%) na maioria dos casos de AIS, em contraste com a maioria das lesões glandulares benignas do colo com índice geralmente inferior a 10% (STOLNICU *et al.*, 2020). Importante considerar que o Ki67 não é um marcador específico de neoplasia,

ao contrário do p16 que marca a atividade oncogênica do HPV, ele é associado a um aumento do turnover celular, como em processos inflamatórios e reacionais (NEGRI *et al.*, 2011).

O p16 e o Ki 67 mostraram ser importantes ferramentas de auxílio diagnóstico na neoplasia glandular cervical, mas ambos apresentam limitações (NEGRI *et al.*, 2011). Sua combinação se mostra útil em alguns casos, particularmente nos raros casos de neoplasia glandular HPV negativo (NEGRI *et al.*, 2011). Na maioria dos casos, o uso isolado do p16 melhora a acurácia diagnóstica da patologia cervical glandular (PINTO *et al.*, 2023). É importante ressaltar que o critério morfológico das lesões permanece sendo o padrão ouro no diagnóstico.

A geminina é expressa nas populações de células proliferativas, amígdalas, linfonodos, espermátócitos, camadas basais do epitélio escamoso, pele e colo do útero, nas glândulas écrinas e folículos pilosos. Ela se mostra na imunohistoquímica destes tecidos normais com coloração nuclear forte. Esse padrão de expressão é típico das células que estão no ciclo celular ativo e sugere que, ao invés de estarem associados à aquiescência celular, a geminina é de fato expressa especificamente nas células que estão ciclando, ou seja, nas células proliferativas. Já nos tecidos com mínima proliferação celular não há importante expressão da geminina, por exemplo, tecido cardíaco, nervos, córtex cerebral, cerebelo, rins pulmão, vasos, glândulas adrenais (WOHLSCHLEGEL *et al.*, 2002)

Em contraste com a expressão da geminina em tecidos normais, onde ela é restrita aos tecidos com maior proliferação, a geminina se mostrou super expressa em tecidos neoplásicos, como tumores de mama, cérvix e cólon, sendo mais acentuada conforme a gravidade do tumor, podendo assim ser útil como ferramenta de auxílio diagnóstico e prognóstico. Estudos sobre o uso da geminina com ferramenta de auxílio diagnóstico mostram que ela aparenta ser eficaz na diferenciação entre lesões intraepiteliais escamosas de baixo e alto grau no colo uterino, mas os trabalhos ainda são escassos (ZHENG *et al.*, 2021).

A avaliação da imuno expressão do p16, Ki 67 e geminina em tecidos normais e em lesões intraepiteliais escamosas de baixo (NIC 1) e alto grau (NIC 2-3) por XING e al. (2016) evidenciaram uma maior acurácia, especificidade e valor preditivo positivo

da geminina na diferenciação da LSIL e HSIL, quando comparado ao p16, demonstrando que a geminina pode vir a ser usada como um novo marcador (XING *et al.*, 2016). Badge *et al.* (2024) evidenciaram uma maior expressão da GMN em lesões de NIC 3 e CEC quando comparados a NIC 1 ou NIC 2 mostrando ser um provável marcador de lesões cervicais de alto grau. Até o presente momento não temos conhecimento sobre estudos sobre a geminina como ferramenta de diagnóstico em adenocarcinoma *in situ* de colo.

4.3.4 Papel do HPV no diagnóstico do AIS/ adenocarcinoma

Apesar de nem todo AIS e adenocarcinoma ser HPV-dependente, aproximadamente 80% têm relação com o vírus, isso justifica a importância dos testes de rastreio com HPV tendo em vista a limitação do diagnóstico citológico e colposcópico. A combinação do teste de citologia com HPV aumenta a sensibilidade da detecção da lesão glandular em 70% (LASHMANOVA *et al.*, 2022).

Zhang *et al.* (2021) conduziram um estudo retrospectivo com 118 mulheres com AIS e adenocarcinoma, onde foi avaliado o impacto do rastreamento com citologia e HPV. Observou-se que a grande maioria das pacientes apresentaram citologia alterada e HPV positivo (78%) mas um grupo proporcionalmente importante se apresentou com HPV positivo e citologia normal (12,7%) e HPV negativo e citologia anormal (9,3%). Esse estudo sugere que, embora a testagem com HPV tenha melhorado o diagnóstico das doenças glandulares, seu uso em conjunto com a citologia oferece maior sensibilidade ao diagnóstico do AIS e adenocarcinoma.

4.4 TRATAMENTO DO AIS

O maior desafio no tratamento do adenocarcinoma *in situ* é a incapacidade de prever com segurança os riscos de doença residual e recorrência como fazemos na doença escamosa. A possibilidade de lesões altas no canal cervical e os focos de AIS não contíguos (*skip lesions*), relatados em 5 a 15% dos casos (SALANI *et al.*, 2009), estudos explicam que, mesmo na presença de margens negativas no cone as taxas

de recorrência e de doença residual ocorrem em até 50% dos casos (SALANI *et al.*, 2009), por isso a histerectomia permanece sendo o tratamento definitivo para a lesão. Como a maioria das pacientes é jovem e ainda não completou sua intenção procriativa, a abordagem conservadora tem sido cada vez mais utilizada e muitas vezes eleita como procedimento definitivo.

O manejo conservador do adenocarcinoma *in situ* inclui a EZT (excisão da zona de transformação), o cone a frio e o SWETZ, sendo que o procedimento excisional ideal consiste na remoção de um espécime intacto para facilitar a interpretação acurada das margens. A excisão fragmentada é inaceitável (TEOH *et al.*, 2020). A profundidade da excisão deve ter pelo menos 10mm e nas múltiparas pode ser aumentada para 18-20mm (TEOH *et al.*, 2020).

Com o uso cada vez mais frequente da abordagem conservadora, vários estudos tentam identificar qual seria a técnica de tratamento mais eficaz. Em 2017, uma revisão sistemática com metanálise demonstrou que o cone a frio e o EZT são igualmente seguros e efetivos, com taxas de positividade de margens semelhantes, assim como doença residual ou recorrente (JIANG *et al.*, 2017), sendo o cone a frio mais relacionado a desfechos obstétricos desfavoráveis. Um ensaio clínico randomizado comparou o cone e a EZT para tratamento de AIS e observou que o EZT não se mostrou associado a um maior comprometimento de margens cirúrgicas, fragmentação da peça ou volumes menores de peça (COHEN, 2020). Já Costales *et al.* (2013), em 172 casos, observaram que mulheres submetidas a EZT apresentaram taxas mais elevadas de comprometimento de margens, se comparadas às submetidas à conização: 55,6% x 35,0%.

As taxas de doença residual e recorrência são os critérios mais importantes para o tratamento do adenocarcinoma *in situ* e o *status* das margens do cone parece ser o melhor preditor de progressão, recorrência e persistência de lesão. Sendo assim, é de extrema importância que essa avaliação seja realizada.

4.5 SEGUIMENTO APÓS TRATAMENTO CONSERVADOR COM AIS

Não há um modelo definitivo de seguimento após o tratamento conservador. Um controle rígido é necessário e geralmente é realizado com citologia, colposcopia e testagem de HPV. Os primeiros 36 meses após o procedimento excisional são os de maior risco de recorrência ou progressão de doença (TEOH *et al.*, 2020)

Apesar da citologia apresentar uma baixa sensibilidade para lesões glandulares ela deve ser realizada a cada 6 meses e apresenta uma sensibilidade de 60% e uma especificidade de 69% na primeira consulta de seguimento, e uma sensibilidade de 66% e uma especificidade de 73% em uma segunda consulta de seguimento (COSTA *et al.*, 2015).

A colposcopia é indicada em alguns protocolos. Já o teste do HPV de alto grau, segundo dados mais recentes, prediz a chance de doença persistente, recorrente ou progressiva significativamente melhor que a citologia. Sua sensibilidade na primeira consulta de seguimento é de 90% e especificidade de 58%, enquanto em uma segunda consulta de seguimento sua sensibilidade é de 84% e especificidade de 59% (COSTA *et al.*, 2015). É o mais forte preditor de recorrência de doença.

As recomendações de seguimento são variadas. No Brasil o resultado de AIS no espécime de excisão indica a histerectomia simples, exceto nos pacientes com prole incompleta onde a conização poderá ser considerada suficiente (INCA, 2022). Nestes casos, se a peça de cone mostrar margens livres de doença, a mulher deverá ser seguida com citologia 6 e 12 meses após o procedimento. A colposcopia é opcional. Após o primeiro ano ela deve ser seguida com citologia anual durante 05 anos. Após esse período, assegurada a inexistência da doença, deverá retomar rastreio trienal com citologia (INCA, 2022).

A Sociedade de Ginecologia Oncológica dos Estados Unidos recentemente publicou recomendações para o manejo do AIS que foram adotadas pela *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology- ASCCP* (PERKINS *et al.*, 2020). A sociedade preconiza a histerectomia para todas as pacientes com prole constituída. Para aquelas que desejem gestar, a conização é aceitável quando as margens se mostram negativas na peça cirúrgica e quando elas são capazes de aderir às recomendações de seguimento que seriam: a realização de consultas semestrais com citologia, HPV e amostragem endocervical nos primeiros 3 anos, depois anualmente

por pelo menos 2 anos ou até realizar histerectomia. Para aquelas que têm resultados negativos nos primeiros 5 anos de seguimento é aceitável retomar rastreio trienal, indefinidamente (TEOH *et al.*, 2020). AASCPP recomenda seguimento com teste HPV ou citologia associada ao HPV a intervalos de 3 anos por pelo menos 25 anos ou ao longo de toda a vida da paciente (PERKINS *et al.*, 2020). Para aquelas com testes de HPV negativos durante o seguimento a conduta conservadora é aceitável como tratamento definitivo (TEOH *et al.*, 2020), desde que tenham apresentado margens livres de doença na peça cirúrgica. Para aquelas que não tenham obtido margens cirúrgicas livres de doença, mesmo após múltiplos procedimentos excisionais, a histerectomia é recomendada (TEOH *et al.*, 2020).

A Sociedade Italiana de Colposcopia e Patologia Cervical (SICPCV) define a histerectomia como o tratamento definitivo de AIS para mulheres que não desejam preservar a fertilidade. Ela também deve ser considerada quando as margens do cone permanecem positivas ou em mulheres com baixa aderência ao seguimento (CIAVATTINI *et al.*, 2019). A conização pode ser realizada naquelas que desejam procriação e a curetagem endocervical (ECC) deve ser realizada imediatamente após o procedimento cirúrgico, quando positiva nova conização é recomendada, pois a taxa de AIS residual é alta (PERKINS *et al.*, 2020). Para considerar a conização com tratamento definitivo é necessário que as margens do espécime cirúrgico sejam livres da doença. O seguimento é realizado com citologia, colposcopia e HPV HR a cada 6 meses durante 2 anos e depois anualmente durante 3 anos. Após este período deve-se manter a citologia anual indefinidamente. A ECC ou citologia de canal deve ser realizada a cada consulta de seguimento.

As diretrizes de rastreamento de câncer de colo do Conselho Australiano de Câncer recomendam a histerectomia para mulheres com diagnóstico histológico de AIS e prole constituída. Para aquelas que realizam o tratamento conservador e tiveram margens livres de doença na peça cirúrgica devem manter controle anual com citologia e HPV-HR, indefinidamente. Se qualquer resultado alterado, é encaminhado para colposcopia para conduta apropriada (ANDERSON *et al.*, 2024)

4.6 FATORES CLÍNICOS E TESTAGEM DO HPV COMO PREDITORES DE PROGNÓSTICO

A doença residual ou persistência da doença após o tratamento excisional em pacientes com NIC 2-3 ou AIS varia de 1,1% a 17,7% e muitos estudos mostram que o risco de neoplasia é de 2,6 a 5 vezes maior nestas mulheres se comparadas à população geral, principalmente nos casos de AIS (SWIFT *et al.*, 2020; COSTA *et al.*, 2007). As principais razões são a remoção incompleta da lesão ou a persistência da infecção pelo HPV de alto risco (COSTA *et al.*, 2007).

Quando se fala em cura, recorrência, persistência ou progressão de AIS após tratamento por conização os principais preditores clínicos além das margens cirúrgicas são idade, visibilidade da JEC, presença do HPV de alto risco, citologias de seguimento e volume do cone. Dentre os preditores de cura, as citologias normais no seguimento, a ausência do HPV de alto risco e a JEC visível à colposcopia são os mais importantes.

Já na predição da recorrência a presença do HPV de alto risco, as margens do cone comprometidas e a não visibilidade da JEC na colposcopia são os fatores mais importantes. O HPV que apresenta maior impacto no risco de recorrência é o HPV 18 (BELKIC *et al.*, 2022). O tabagismo também parece exercer um efeito importante na recorrência da doença (BELKIC *et al.*, 2022), e há estudos que mostram que a presença do adenocarcinoma *in situ* isolado como achado incidental de cone é fator de risco para recidiva e persistência de lesão (MUNRO *et al.*, 2017). O teste do HPV é o preditor independente mais importante de recorrência ou progressão de doença no AIS tratado com conização (BELKIC *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2007).

Com relação à persistência da doença os riscos são maiores quando a idade é superior a 30 anos (MUNRO *et al.*, 2017), quando é maior o número de quadrantes envolvidos pela doença (KRIVAK *et al.*, 2001), quando o HPV de alto risco está presente e as citologias de seguimento são anormais. A combinação do teste HPV e a citologia alcançam 90% de sensibilidade na detecção de lesões persistentes na primeira visita de seguimento e 100% de sensibilidade na segunda visita de seguimento (COSTA *et al.*, 2007).

Na progressão da doença o fator prognóstico mais importante é a presença do HPV de alto risco seguido por margens comprometidas (COSTA *et al.*, 2015). Pacientes mais jovens geralmente têm lesões de menor volume as tornando melhores candidatas ao tratamento conservador (KRIVAK, 2001). Os AIS HPV associados apresentam um melhor prognóstico.

4.7 BIOMARCADORES COMO FATORES DE PROGNÓSTICO

4.7.1 p16 e Ki 67

A importância dos biomarcadores como ferramentas auxiliares no diagnóstico de lesões do colo já é bem estabelecida, no entanto sua utilização como marcadores de prognóstico permanece controversa. Os estudos sobre o valor preditivo do p16, Ki-67 e geminina no prognóstico de lesões cervicais são limitados, apresentam resultados inconsistentes e geralmente estão relacionados às lesões escamosas. Os biomarcadores podem ter um papel importante na estratificação das pacientes que necessitem de uma abordagem mais completa, como um seguimento mais longo ou terapias adjuvantes como QT e RT, principalmente naquelas que clinicamente seriam classificadas como baixo risco de recorrência baseadas nos critérios clínicos como tamanho do tumor, tipo histológico e comprometimento de linfonodos (YAGI *et al.*, 2014)

O p16 é um marcador da atividade da oncoproteína E7 do HPV, que ao se integrar ao genoma do hospedeiro leva a uma proliferação celular sem controle com perda da integridade do DNA. O aumento da p16 é uma tentativa de inibir essa proliferação e marca, assim, as lesões HPV transformantes (PINTO *et al.*, 2023)

O Ki67 é um marcador de proliferação e é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase 0. Ele não é um marcador de neoplasia, também está presente nos tecidos normais, mas somente nas camadas basais, onde há uma maior proliferação. Marcadores biológicos de proliferação têm sido estudados como indicadores de prognóstico e de resposta a tratamento em inúmeros tecidos, ajudando assim a identificar pacientes de maior risco e estratificando a melhor terapêutica (KUKU *et al.*, 2015). Marcadores de proliferação como o Ki 67 têm sido estudados

como indicadores de prognóstico em inúmeros tecidos. O Ki 67 é um dos marcadores mais importantes no câncer de mama e de endométrio (TU *et al.*,2022), seu índice elevado geralmente está associado a um maior risco de recidiva e uma pior sobrevida. No câncer de colo o Ki 67 tem se mostrado relevante como preditor de prognóstico, mas ainda não há consenso com relação ao valor de corte a ser usado. Yuan Tu *et al.* (2022) avaliaram 1.130 mulheres com câncer cervical estágios 1-2 e demonstrou que pacientes com índice de Ki 67 superiores a 42% apresentaram uma maior taxa de recorrência e menor taxa de sobrevida (TU *et al.*,2022).

Já Wu *et al.* (2024), em um estudo com 334 mulheres com carcinoma cervical 1B2-2A2 submetidas à QT após cirurgia, mostraram que o Ki 67 se mostrou um fator de prognóstico independente para recorrência de doença, sendo o ponto de corte de 67,5% determinado através da curva ROC.

A relação do p16 e prognóstico é mais controversa. Wu *et al.* não encontrou associação do marcador com prognóstico (WU *et al.*, 2024). Huang *et al.* (2014), avaliando 1070 mulheres com câncer de colo uterino escamoso ou glandular, não demonstraram associação entre a expressão do p16 e a sobrevida total, mas evidenciou associação entre o marcador e a sobrevida livre da doença. A teoria de que o HPV de alto risco é o fator desencadeante para o desenvolvimento do câncer de colo, mas que concomitantemente induz um mecanismo de proteção mediado pelo próprio p16 é usada para justificar esse achado.

Um estudo de 194 mulheres com tumores de colo de útero HPV positivo avaliou a relação do tipo de HPV e a imuno expressão do p16 com o prognóstico do câncer. Nele se observou que o tipo de HPV ou a presença de infecção única ou múltipla por HPV não influenciaram na sobrevida geral ou na sobrevida livre de doença, mas que os tumores p16 negativos apresentaram uma pior sobrevida geral se comparados aos p16 positivos. Alguns mecanismos explicam a ausência do p16 em tumores HPV associados: perda da heterozigidade, mutações do p16, silenciamento do gene pela hipermetilação do promotor ou um resultado falso positivo do HPV por limitações do método (NICOLÁS *et al.*, 2020).

Outro estudo retrospectivo com 1800 pacientes submetidas a cone por lesão de alto grau, todas com margens negativas, observou que a expressão do p16 e Ki-

67 se mostrou associada a uma maior taxa de recorrência de lesão (WANG et al., 2020). Nesse estudo foi definido como imunohistoquímica positiva quando houvesse distribuição difusa de células positivas (coradas) ao longo de todo epitélio. Nenhum ponto de corte foi dado para o Ki 67.

Um estudo prospectivo com 83 pacientes submetidas a conização por NIC 2 ou 3 observou que o grupo que apresentou recidiva ou progressão da doença apresentava uma expressão de p16 significativamente mais alta, sugerindo sua utilização como biomarcador de prognóstico (CARDOSO *et al.*, 2013). Já *Ishikawa et al.* (2021) observaram uma maior sobrevida livre de doença e maior sobrevida geral nas pacientes de adenocarcinoma com expressão positiva de p16.

Alguns estudos ainda correlacionam a expressão do p16 e a maior probabilidade de progressão das lesões intraepiteliais escamosas. *Negri et al.* (2010) verificaram uma associação significativa entre expressão difusa do p16 e progressão da lesão escamosa de colo de baixo para alto grau, assim como expressão negativa de p16 e uma maior regressão de LSIL. *Miyamoto et al.* (2015) observaram que a expressão forte de p16 e a positividade do Ki 67 (% células coradas > 50%) foram preditores significantes de progressão de NIC 2. Já *Ding et al.* (2020) mostraram uma maior expressão do p16 e Ki-67 nas lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau que progrediram para lesão de alto grau.

4.7.2 GEMININA

Estudos em tecidos neoplásicos sanguíneos, de mama, pênis, ovário, cólon e SNC vêm demonstrando que a expressão da geminina se mostra mais acentuada nas neoplasias mais agressivas sugerindo seu uso como marcador de prognóstico. Em linfomas de células B sua expressão apresentou relação direta com o grau de proliferação, no câncer de mama à resultados clínicos adversos e maior grau do tumor, no câncer de cólon uma maior expressão da geminina foi encontrada em lesões invasivas e metastáticas e nos tumores do SNC sua expressão aumentada se correlacionou a tumores de maior grau. Em câncer de células renais a expressão da

geminina também se relacionou à progressão da doença e no melanoma a expressão aumentada da geminina se correlacionou a uma menor sobrevida (KUKU *et al.*, 2015).

No estudo de Haruki *et al.* (2011) foi avaliado o significado prognóstico da geminina no adenocarcinoma de pulmão menor de 3 cm e evidenciou que a geminina se mostrou super expressa nos carcinomas não broncoalveolares (não- BAC) que tem um pior prognóstico. O estudo de Gonzalez *et al.* (2004) comparou a expressão da geminina em tecido normal e neoplásico de mama e observou que a mesma se mostrava alta nos tecidos com neoplasia e baixa no tecido normal. Observou também que a geminina foi um marcador independente de desfecho clínico adverso.

Kushwaha *et al.* (2016) também demonstraram uma expressão significativa da geminina no câncer de mama e sua atuação como marcador independente de prognóstico adverso, menor sobrevida e metástases a distância. Loddo *et al.* (2009) investigaram a hipótese de que um fenótipo de biomarcadores de ciclo celular (painel de biomarcadores) poderia trazer informações sobre o comportamento e a progressão da neoplasia mamária e que essa avaliação poderia estratificar as pacientes que se beneficiariam de agentes quimioterápicos específicos para o ciclo celular. Foram estudados biomarcadores reguladores de ciclo nas fases G1-S e G2-M, entre eles a GMN. A GMN mostrou uma forte associação com o grau do tumor e a instabilidade genômica, assim como se mostrou um preditor independente de sobrevida livre de doença. Ele classificou a neoplasia de mamas em 3 tipos, baseado em um painel com MCM- Ki67 e GMN e evidenciou que tumores com alta expressão de MCM2 e GMN tinham um pior prognóstico se comparados a tumores com baixa expressão de MCM ou com MCM alto e baixa GMN.

Yagi *et al.* (2014) avaliaram o uso da GMN em tumores de mama ER +, HER2 negativo e Ki-67 elevado, que por protocolo responde a quimioterapia. A intenção foi avaliar dentre essas pacientes quais não seriam sensíveis à QT. Apesar do estudo não conseguir responder essa questão, ele evidenciou que a GMN elevada nestes tumores é preditora de mau prognóstico. O autor sugere que a GMN, por ser marcador de ciclo ativo, justifique esse resultado.

No câncer de colo de útero poucos estudos foram realizados com a geminina. A relação da expressão das proteínas MCM, Ki-67 e GMN como preditores de grau-

estadiamento e desfecho clínico em pacientes com câncer de colo (28 CEC e 7 adenocarcinomas) foi estudada por Kuku *et al.* (2015) relataram que não foi observada relação com a sobrevida geral e sobrevida livre da doença, nem com a diferenciação do tumor.

A relação entre a expressão da GMN e a maior probabilidade de progressão das lesões intraepiteliais escamosas foi estudada por Zheng *et al.* que observou que as LSIL que progrediram para HSIL/ câncer de colo apresentaram ao longo da evolução uma expressão crescente da GMN se comparado a expressão inicial e que as que não progrediram mantiveram a mesma expressão ou mais fraca, indicando um possível papel de marcador de prognóstico para a GMN (ZHENG *et al.*, 2021).

5 HIPÓTESE

Nossa hipótese é que a imunomarcção com p16, Ki 67 e geminina possa estratificar as pacientes de adenocarcinoma *in situ* de colo com relação ao prognóstico, permitindo um tratamento mais conservador para as de menor risco e mais agressivo para aquelas de maior risco.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 SELEÇÃO DOS CASOS

Trata-se de um estudo de corte transversal, retrospectivo e não intervencional. Foram estudados casos a partir de blocos de parafina dos arquivos do serviço de patologia do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) em Curitiba, dos arquivos do serviço de patologia do Instituto Fernandes Figueira- IFF- FIOCRUZ no Rio de Janeiro e dos arquivos do serviço de patologia do Laboratório Jarbas Dolles em Goiânia. Pacientes submetidas à conização de agosto de 2007 a maio de 2023 com adenocarcinoma *in situ* confirmado histopatologicamente foram incluídas no estudo. Os casos foram identificados a partir das bases de dados eletrônicos destes 3 serviços. Após aplicados os critérios de inclusão e exclusão, trinta casos se mostraram disponíveis para a pesquisa.

6.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

6.2.1 Critérios de inclusão

Blocos de parafina com diagnóstico de AIS isolado ou associado à NIC 1-2-3, de pacientes submetidas à conização com seguimento, cujos tecidos remanescentes permitiram a confecção de novos cortes histológicos para HE, imunohistoquímica para p16, Ki 67 e geminina sem que houvesse consumo total da amostra de forma que ainda ficasse material disponível em arquivo para futuras pesquisas.

6.2.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão para este estudo são bastante específicos e abrangem diversas áreas. Primeiramente, se os patologistas não concordarem com o

diagnóstico inicial de AIS, o caso será excluído. Além disso, se houver adenocarcinoma ou CEC associado ao AIS, o caso também será descartado. A ausência de material no arquivo de anatomia patológica ou material insuficiente para revisão de diagnóstico em HE e imunohistoquímica é outro critério de exclusão. Casos com falta de dados em prontuários ou com HT com menos de 6 meses da conização também serão excluídos. Por fim, se não houver pelo menos uma consulta de acompanhamento após a cirurgia, o caso não será considerado para o estudo. Esses critérios garantem que apenas os casos mais relevantes e completos sejam incluídos no estudo

6.3 REVISÃO HISTOPATOLÓGICA:

Todos os blocos obtidos foram submetidos a cortes de 4 micras para confecção de lâminas que foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) e avaliadas por 2 patologistas experientes do CHC-UFPR e do IFF- FIOCRUZ, de forma independente, sem o conhecimento de dados clínicos, mas com o conhecimento do diagnóstico inicial do cone. A análise das lâminas histológicas obedeceu a critérios morfológicos conforme padrão diagnóstico da Organização Mundial da Saúde. Só foram incluídos casos com diagnósticos concordantes e inequívocos de adenocarcinoma *in situ*.

6.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

6.4.1 Técnica da imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada no departamento de anatomia patológica da Universidade Federal do Paraná, pelo método manual, por um único técnico e sua interpretação foi realizada por 2 patologistas, cegos para os detalhes clínicos.

De cada bloco foram realizados cortes de 3 micras e montados em lâminas silanizadas, sendo uma para imunohistoquímica com p16, uma para Ki 67 e uma para geminina. Cada lâmina continha além do tecido a ser avaliado um controle positivo e um

controle negativo, que variavam de acordo com o biomarcador usado. Para o controle de qualidade positivo externo foram usados casos sabidamente positivos para os anticorpos p16 e Ki-67 e geminina. Para o p16 foi utilizado tecido de carcinoma escamocelular invasor HPV induzido. Para o Ki 67 e para a geminina foi utilizado tecido de amígdala. Como controle de qualidade interno foram utilizadas as glândulas endocervicais sem displasia.

O marcador p16 foi adquirido na empresa Erviegas (p16 INK4A, clone BC42, isotipo IgG1- marca Biocare- 0,1 ml- lote 030823A) e o Ki-67 foi adquirido na empresa Inopat (anticorpo monoclonal coelho anti-Ki-67; SP6- 0,1 ml- 275R-14, cell marque-lote 163556). O marcador geminina foi cedido pelo laboratório de patologia da UFPR (geminina clone 1A8- Abcam). Foi utilizado o kit de sistema de detecção HRP-Polymer Detection, sistema de revelação por cromógeno Diaminobenzadina (DAB), contra coloração com hematoxilina e lâminas montadas em meio de inclusão. Os processos de diluição e coloração seguiram as orientações dos fabricantes.

Após o preparo das lâminas as mesmas foram submetidas aos seguintes processos: desparafinização, recuperação antigênica com citrato pH 6,0, bloqueio de proteínas e aplicação dos anticorpos primários p16, ki 67 e geminina (pré diluídos), seguidos de amplificação de reações e revelação do substrato cromógeno e, por fim, submetidas a contracoloração e encaminhadas ao patologista para análise sob microscópio óptico.

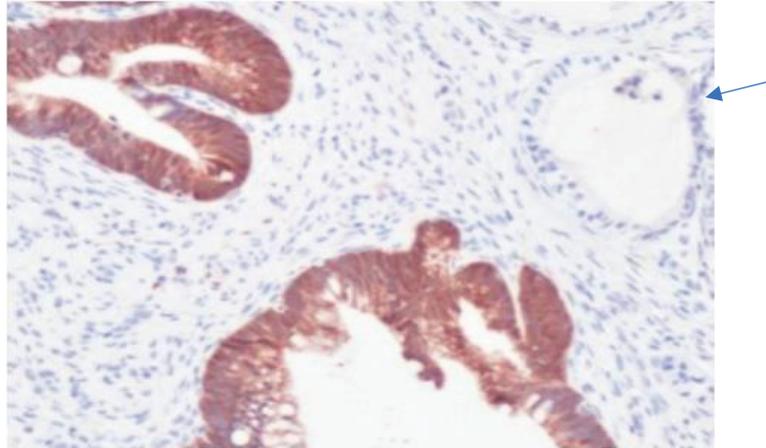
6.4.2 Avaliação das marcações imunohistoquímicas

A avaliação da expressão dos biomarcadores p16, Ki 67 e geminina foi realizada por 2 patologistas independentes, cegos para o desfecho clínico. Os casos de não concordância foram definidos pela avaliação de maior gravidade (positividade do p16 ou maior percentual de imunoexpressão do Ki 67 ou geminina).

MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA REAÇÃO COM O ANTICORPO p16 (clone BC42/ Biocare). A avaliação da expressão do marcador p16 foi realizada por observação, em microscópio óptico, sinalizando a marcação nuclear e citoplasmática

forte e em bloco que define a positividade do p16 (PARKASH *et al*, 2023; SINGH *et al*, 2018). A terminologia usada é: Expressão positiva difusa anormal.

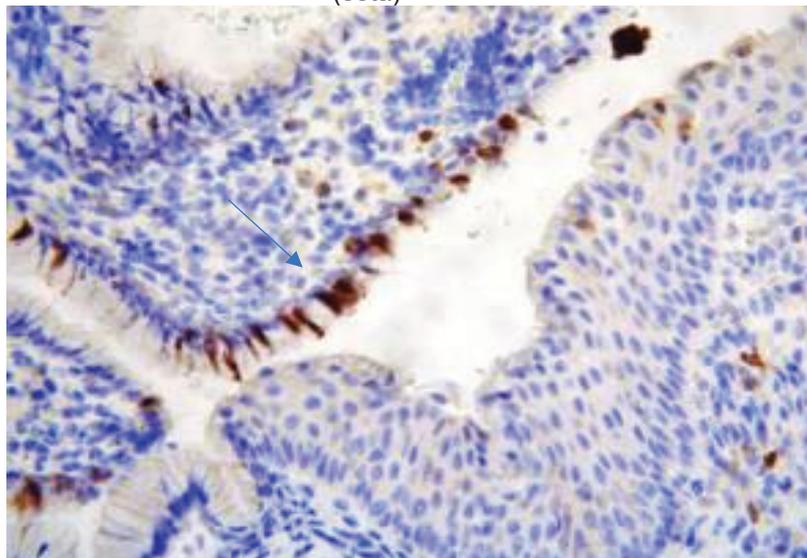
FIGURA 4 - EXPRESSÃO FORTE E DIFUSA DO P16 EM NÚCLEO E CITOPLASMA NO TECIDO DE ADENOCARCINOMA *IN SITU* CONTRASTANDO COM A GLÂNDULA NORMAL ADJACENTE (seta)



FONTE: Singh *et al* (2018)

O epitélio endocervical normal apresenta coloração completamente negativa, mas ocasionalmente pode exibir uma coloração irregular

FIGURA 5 - EPITÉLIO GLANDULAR NORMAL COM POSITIVIDADE FRACA E IRREGULAR DO P16 (seta)

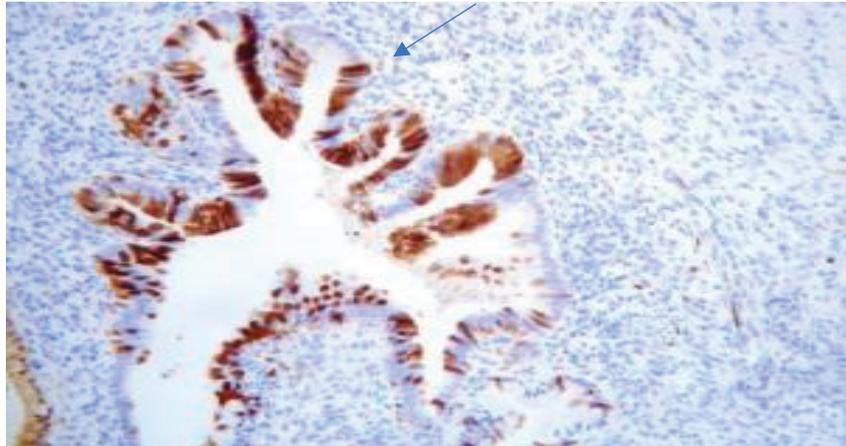


FONTE: Singh *et al* (2018)

No epitélio reativo, ocasionalmente, podem se observar células coradas positivamente, mas estas são em geral fracamente coradas e com coloração dispersa

irregularmente dentro do epitélio, a metaplasia tubo-endometrial e epitélio endometrial do segmento uterino inferior geralmente apresentam essa coloração.

FIGURA 6 - METAPLASIA TUBO ENDOMETRIAL COM POSITIVIDADE FRACA E IRREGULAR DO P16 (seta)



FONTE: Singh *et al* (2018)

MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA REAÇÃO COM O ANTICORPO KI-67 (Clone SP6/ Cell marque)

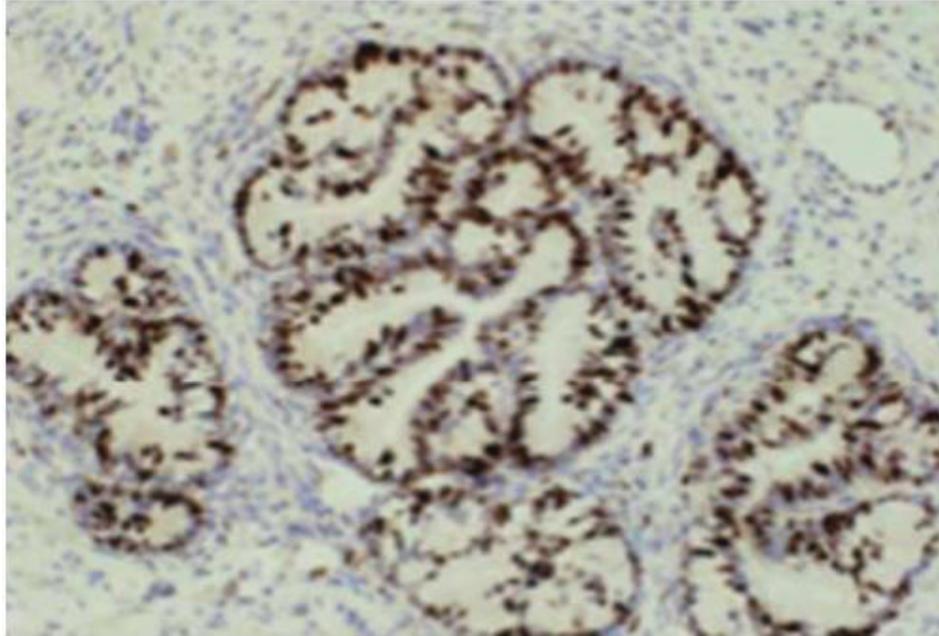
A avaliação da expressão do marcador Ki-67 foi realizada por observação, em microscópio óptico, sinalizando a marcação nuclear no epitélio colunar endocervical neoplásico e não neoplásico em intervalos com acréscimos regulares de 10%. (1-10%; 11-20%; 21-30%; 31-40%; 41-50%; 51-60; 61-70%; 71-80%; 81-90%; 91-100%). O índice de proliferação do Ki 67 é avaliado pela contagem de uma média 500 a 1000 células e é relatado como porcentagem de células positivas.

Não há um valor de corte validado para a positividade de coloração do Ki 67 no epitélio glandular. Stolnicu *et al.* (2020) revisaram sobre as lesões precursoras do adenocarcinoma, expõe que o índice de proliferação é superior a 30% na maioria dos casos de AIS, em contraste com as lesões glandulares benignas que apresentam o índice de Ki 67 geralmente inferior a 10%.

Nessa pesquisa foi usado o valor de 30% como ponto de corte, acima deste valor foi considerado o marcador como positivo. A marcação com Ki 67 é vista como

uma coloração nuclear marrom escura/ preta nas células que expressam o antígeno Ki 67.

FIGURA 7- IMUNOEXPRESSÃO DO KI 67 NO ADENOCARCINOMA *IN SITU*



FONTE: Stolnicu *et al.* (2020)

MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA REAÇÃO COM O ANTICORPO GEMININA (clone 1A8 /ABCAM):

A avaliação a expressão do marcador geminina foi realizada por observação, em microscópio óptico, através da porcentagem de células com positividade nuclear nas áreas neoplásicas, sinalizando a marcação nuclear no epitélio colunar endocervical neoplásico e não neoplásico, em intervalos com acréscimos regulares de 10% (1-10%; 11-20%; 21-30%; 31-40%; 41-50%; 51-60%; 61-70%; 71-80%; 81-90%, 91-100%).

Não há um valor de corte validado para a positividade da coloração da geminina na literatura. A sua expressão se encontra aumentada nos tecidos normais proliferativos, como tecidos de amígdala e linfonodos, onde se observa uma coloração nuclear forte e contínua, sendo o mesmo observado em tecidos tumorais. Em tecidos com pouca proliferação celular a sua expressão se apresenta como raras células com núcleo positivo (WOHLSCHEGEL *et al.*, 2002; XING *et al.*, 2016). Xing *et al.* (2016)

consideraram a expressão positiva da geminina quando mais do que 5% das células demonstravam coloração nuclear positiva forte. Bagde *et al.* (2024) evidenciaram que 100% dos NIC 3 e 96,29 % dos carcinomas escamosos em seu estudo apresentavam positividade de geminina superior a 26%. Ambos os estudos foram realizados em neoplasias intraepiteliais escamosas.

Kuku *et al.* (2015), em um estudo sobre a GMN como fator de prognóstico em câncer de colo do útero, encontraram valores de geminina superiores a 25% nos adenocarcinomas. Um estudo sobre a expressão da geminina em tecidos normais e neoplásicos conduzido por Wohlschlegel *et al.* (2002) mostrou que o número de células que expressam a GMN é diretamente proporcional ao índice de proliferação celular medido pela expressão do Ki 67. Assim sendo, foi utilizado o valor de 30% como ponto de corte, acima deste valor o marcador foi considerado como positivo.

6.5 REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS MÉDICOS

Os prontuários físicos e eletrônicos foram revisados para obtenção de dados clínicos que foram tabelados adequadamente em uma planilha do *software* Excel para posterior avaliação estatística. As seguintes variáveis foram coletadas:

6.5.1 Dados demográficos e sociais: idade ao diagnóstico, tabagismo, paridade.

As categorias de tabagismo consideradas foram tabagistas e não tabagistas (ex tabagistas foram consideradas tabagistas) e a paridade foi definida como nullípara, primípara e multípara (mais que 2 partos).

6.5.2 Citologia de encaminhamento

Foram consideradas as categorias de Baixo grau (ASC-US e LSIL), Alto grau (ASC-H, HSIL), AGC, AIS e normal.

6.5.3 Colposcopia

Seus achados foram divididos em 3 categorias: sem lesões, achados menores ou achados maiores, de acordo com a terminologia colposcópica do colo uterino, IFCPC 2011.

6.5.4 Resultado da biópsia durante colposcopia

Quando realizada foi classificado em AIS, AIS+NIC2/3, NIC2/3 e negativo/NIC1.

6.5.5 Técnica cirúrgica realizada

Cirurgia de alta frequência (CAF) ou cone a frio

6.5.6 Margens cirúrgicas

Foi avaliado, de forma independente, o comprometimento das margens ectocervical e endocervical. As margens foram consideradas comprometidas quando havia lesão de adenocarcinoma *in situ* a menos de 1 mm de distância das margens da peça cirúrgica.

6.5.7 Volume do cone

Obtido através da multiplicação das medidas dos diâmetros anteroposterior e látero-lateral e da profundidade da peça depois de colocada em formol, medidas estas descritas no laudo anatomopatológico da peça cirúrgica.

6.5.8 Seguimento pós cirurgia

O tempo de seguimento foi definido em dias corridos a partir da data da conização até a última consulta, a medida usada foi de meses. Os dados de consultas posteriores à cirurgia foram registrados, com especial atenção à resultados de citologia, colposcopia, rastreio de HPV (quando presente) e procedimentos cirúrgicos adicionais em colo uterino. O seguimento se deu com consultas semestrais a partir da data da cirurgia.

Foi definido como grupo livre de doença aquele com ausência de AIS ao longo de todo seguimento e grupo com recidiva de doença, aquele que apresentou um novo diagnóstico de adenocarcinoma *in situ* em qualquer momento do seguimento.

Não há um consenso na literatura com relação à definição de recidiva. Para Munro *et al* se trata da presença do mesmo tipo histológico de lesão após 1 ano da conização (MUNRO *et al.*, 2017). Swift *et al* (2020) definiram recidiva como a presença de lesão de NIC 3/ AIS em um período de 1 a 5 anos após o tratamento com conização. Baskota *et al.* (2021) avaliaram persistência e recidiva do AIS após conização conjuntamente, sem definição de período. Já Costales *et al.* (2013) definiram doença recorrente como a presença do AIS após 3 meses da conização.

7 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CHC-UFPR e aprovado, sendo registrado sob o número 5.928.024 e sua emenda sob o número 6.109.326. Foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IFF/FIOCRUZ e aprovado, sendo registrado sob o número 6.326.792. O termo de consentimento livre e esclarecido foi dispensado por se tratar de estudo retrospectivo.

8 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. A associação do desfecho de pesquisa com as variáveis qualitativas foi realizada pelos testes: Qui-quadrado de Pearson ou Teste exato de Fisher (AGRESTI, 2007).

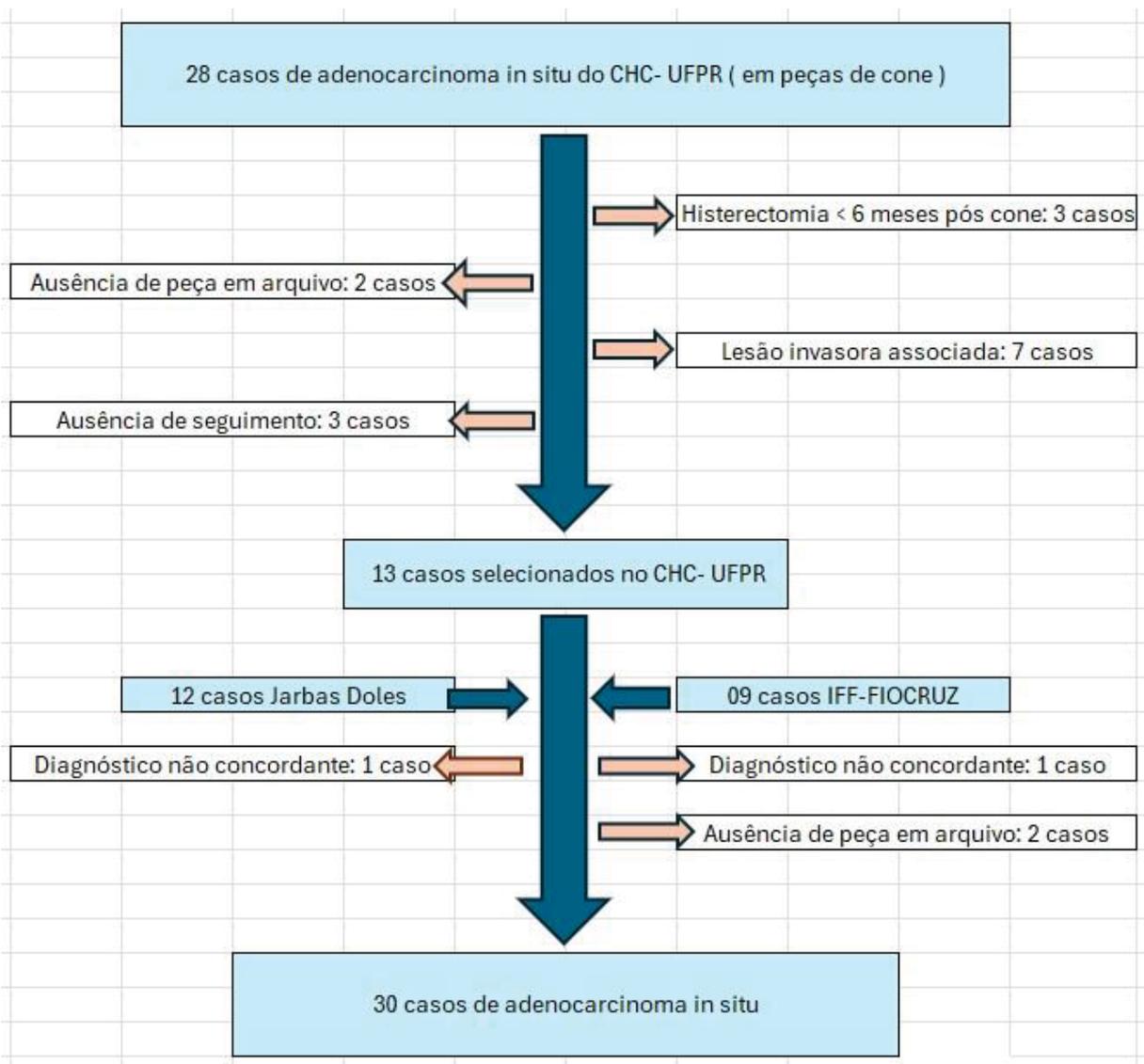
A comparação entre a variável explicativa qualitativa e as variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney* ou Teste de *t-Student* (NETO, 2002; SIEGEL, 2006). Os modelos lineares generalizados foram utilizados para determinar o impacto das variáveis explicativas no desfecho de interesse de forma multivariada (LINDSAY, 1997).

As variáveis explicativas com nível de significância de até 20%, nas análises bivariadas elencadas entraram na seleção de variáveis do GLM. O método de seleção de variáveis utilizado foi o *Backward* (LINDSAY, 1997). Os dados foram balanceados através da técnica de *Random Over Sampling Examples* (ROSE) utilizando o pacote ROSE. O método de ROSE cria uma amostra de dados sintéticos ampliando o espaço de recursos da classe minoritária ou majoritária (MENARDI, 2014).

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 4.3.2 (RCORE TEAM, 2021).

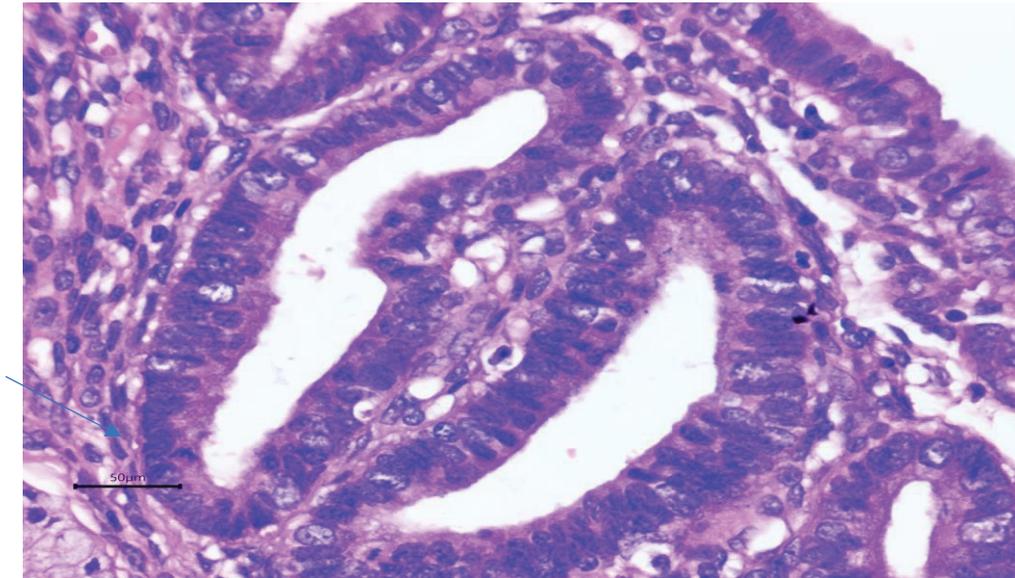
9 RESULTADOS

Foram identificados 28 casos de cones com diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma *in situ* no CHC-UFPR, após critérios de exclusão 13 casos foram selecionados para estudo. Dos 12 casos do Jarbas Doles, 01 foi excluído por discordância diagnóstica e dos 09 casos do IFF-FIOCRUZ, 01 foi excluído por discordância diagnóstica e 2 por ausência de peça em arquivo. Trinta casos se mostraram disponíveis para a pesquisa.



Na figura 8 podemos observar a representação histológica do adenocarcinoma *in situ* do colo uterino com coloração de hematoxilina-eosina.

FIGURA 8 - ADENOCARCINOMA *IN SITU* NA HISTOLOGIA (HE): NÚCLEOS VOLUMOSOS E HIPERCROMÁTICOS COM CITOPLASMA ESCASSO.



MICROFOTOGRAFIA COM AUMENTO DE 400X.
PROXIMO À BARRA DE TAMANHO HÁ UMA MITOSE (seta)

FONTE: Patrícia Pereira Pinto (2024)

Inicialmente apresentamos a análise descritiva para avaliação dos dados. Na tabela 1 observa-se as variáveis quantitativas da amostra.

A presente amostra apresentou uma média de idade de 34,5 anos e um desvio padrão de 6,88, com idade mínima de 24 anos e máxima de 49 anos.

TABELA 1 – RESULTADOS DESCRITIVOS DAS VARIÁVEIS QUANTITATIVAS DA AMOSTRA

Variável (Número)	Média (DP)	Mediana (IIQ)	Mínimo-Máximo	p-valor
Idade ao diagnóstico (30)	34,5 (6,88)	33,5 (30,25-38)	24-49	0,190
Volume cone (22)	7,42 (6,87)	5,06 (3,05-7,4)	1,63-28,8	<0,001
Tempo seguimento-meses (30)	28,7 (34,99)	20 (9-26,25)	2-144	<0,001

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

DP = Desvio-padrão.

Itálico: Medida descritiva preferencial para interpretação de acordo com a distribuição da variável.

p-valor = Teste de Shapiro-Wilk (nível de significância de 5%).

O volume do cone apresentou uma mediana de 5,06 cm³, sendo seu valor mínimo de 1,63 cm³ e máximo de 28,8 cm³. Já o tempo de seguimento apresentou uma mediana de 20 meses, variando entre 2 e 144 meses.

A tabela 2 apresenta as variáveis qualitativas.

TABELA 2 – RESULTADOS DESCRITIVOS DAS VARIÁVEIS CATEGÓRICAS DA AMOSTRA (CONTINUA)

Variáveis	Classe	Número	Frequência (%)
Tabagismo	Não	16	69,57
	Sim	7	30,43
	NA	7	-
Paridade	Nulípara	11	44,00
	Primípara	6	24,00
	Multípara	8	32,00
	NA	5	-
Citologia de encaminhamento	AGC	6	21,43
	AIS	6	21,43
	LIEAG	12	42,86
	LIEBG	3	10,71
	Normal	1	3,57
Colposcopia	NA	2	-
	Achado maior	25	86,21
	Achado menor	3	10,34
	Sem lesão	1	3,45
Resultados de biópsia	NA	1	-
	AIS	13	52,00
	AIS + NIC 2/3	5	20,00

	NIC 2/3	5	20,00
	NIC 1	1	4,00
	Inconclusiva	1	4,00
	NA	5	-
Técnica cirúrgica	Cone a frio	8	28,57
	CAF	20	71,43
	NA	2	-
Margem ectocervical	comprometida	3	11,54
	livre	23	88,46
	NA	4	-
Margem endocervical	comprometida	6	22,22
	livre	21	77,78
	NA	3	-
p16	negativo	3	10
	positivo	27	90
Ki67	negativo	1	3,33
	positivo	29	96,67
Geminina	negativo	2	6,67
	positivo	28	93,33
Seguimento	livre de doença	27	90
	recidiva	3	10

Nota: NA- Sem dados; AGC- atipia celular glandular; LIEAG- lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LIEBG- lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; NIC- neoplasia intraepitelial cervical; AIS-adenocarcinoma in situ; CAF- cirurgia de alta frequência

Em amostra do presente estudo, 69,7% das pacientes eram não tabagistas e 44% eram nuligestas. Nas citologias de encaminhamento 53,57% das pacientes mostraram lesões escamosas das quais 42,86% eram de alto grau e 10,71% de baixo grau, enquanto 21,43% apresentaram AGC e 21,43% AIS. 3,57% das mulheres apresentaram citologia normal.

A avaliação colposcópica apresentou achados maiores em 86,21% dos casos. Somente 10,34% dos achados colposcópicos foram menores e 3,45% normais. Quanto às biópsias realizadas durante a colposcopia 72% evidenciaram AIS, sendo que destas 20% eram associadas a NIC 2/3, 20% das biópsias se apresentaram como HSIL, 4% como LSIL e 4% foram inconclusivas.

Em 71,43% dos casos a técnica cirúrgica escolhida foi o CAF e em 28,57% o cone a frio. As margens ectocervicais da peça cirúrgica se mostraram comprometidas em 11,54% dos casos e livres em 88,46%, enquanto as margens endocervicais se mostraram comprometidas em 22,22% e livres em 77,78% dos casos.

Quando se avaliou a imunomarcação, a quase totalidade dos casos foi positiva para p16- 90%, Ki 67-96,67% e para a Geminina-93,33%. Nos tecidos controle, usados para avaliar a qualidade da imunomarcação, a geminina marcou igualmente positiva para o tecido saudável e para AIS, o mesmo não foi visto no p16 e Ki 67. Nossa amostra apresentou 10% de recidiva de doença.

A imunomarcação foi avaliada nos 30 casos. A expressão da proteína p16 foi considerada positiva quando a coloração nuclear e citoplasmática se apresentava forte e em bloco, como ilustra a figura 9.

FIGURA 9 - IMUNOHISTOQUÍMICA COM P16 EM TECIDO GLANDULAR NORMAL (Fig. a) E NO ADENOCARCINOMA *IN SITU* (Fig. b)

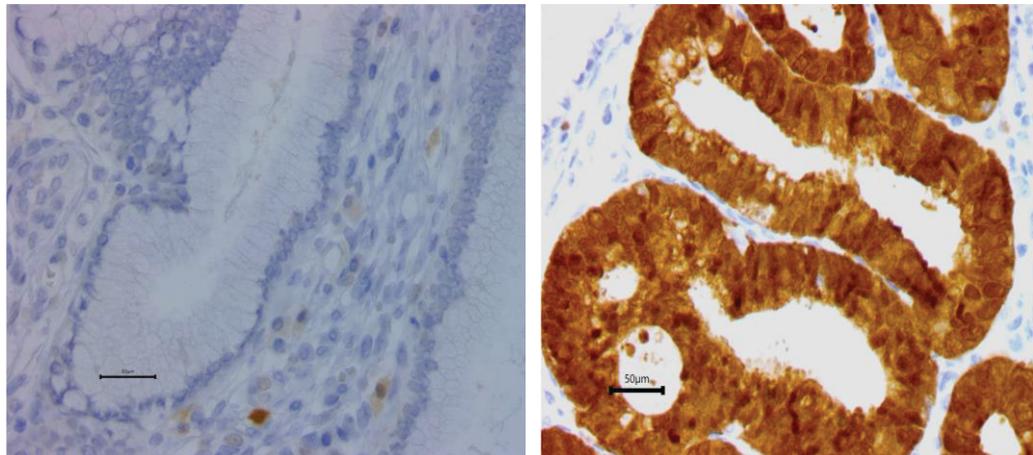


Fig. a

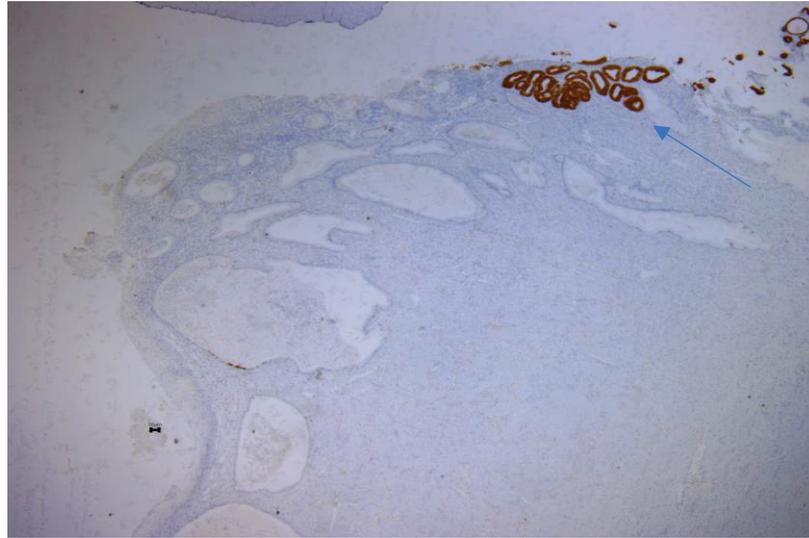
Fig. b

MICROFOTOGRAFIA COM AUMENTO DE 400X

Observa-se a ausência da imuno marcação na glândula normal e marcação nuclear e citoplasmática forte e difusa (coloração marrom) no adenocarcinoma in situ

FONTE: Patrícia Pereira Pinto (2024)

FIGURA 10 - VISÃO PANORÂMICA DO EPITÉLIO GLANDULAR NORMAL E O ADENOCARCINOMA *IN SITU* (COLORAÇÃO MARROM- seta) NA IMUNOHISTOQUÍMICA COM P16



FONTE: Patrícia Pereira Pinto (2024)

A expressão da proteína Ki 67 foi considerada positiva quando o índice de proliferação era superior a 30%

FIGURA 11 - IMUNOHISTOQUÍMICA COM KI 67 EM TECIDO GLANDULAR NORMAL (Fig. a) E NO ADENOCARCINOMA *IN SITU* (Fig. b).

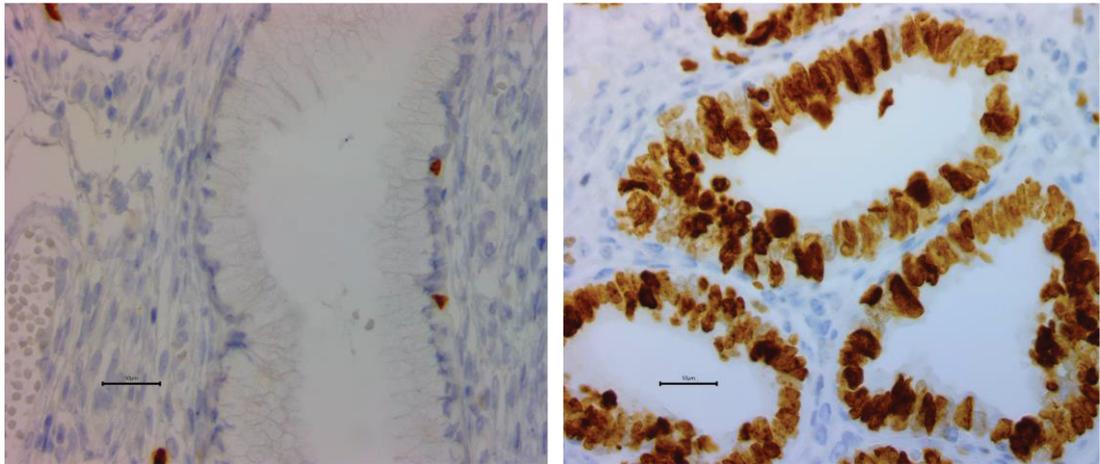


Fig. a

Fig. b

MICROFOTOGRAFIA COM AUMENTO DE 400X

Observa-se a ausência da imuno marcação na glândula normal e marcação nuclear (coloração marrom) no adenocarcinoma *in situ*

FONTE: Patrícia Pereira Pinto (2024)

FIGURA 12 - VISÃO PANORÂMICA DO EPITÉLIO GLANDULAR NORMAL E O ADENOCARCINOMA *IN SITU* (COLORAÇÃO MARROM-seta) NA IMUNOHISTOQUÍMICA COM KI 67



Observa-se a esquerda a marcação do epitélio basal escamoso (seta larga)

FONTE: Patrícia Pereira Pinto (2024)

A expressão da geminina foi considerada positiva quando o índice de proliferação era superior a 30%.

FIGURA 13 - IMUNOHISTOQUÍMICA COM GEMININA EM TECIDO GLANDULAR NORMAL (Fig. a) E NO ADENOCARCINOMA *IN SITU* (Fig. b)

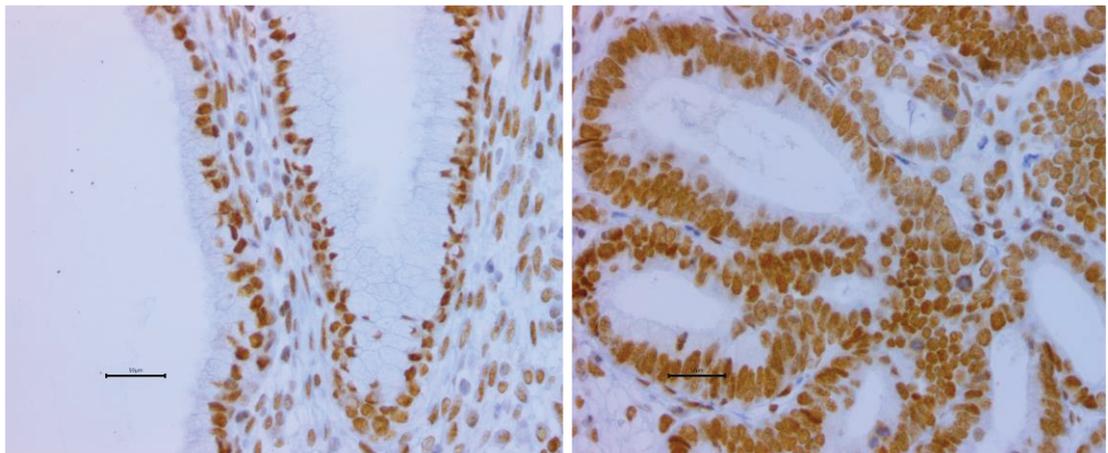


Fig. a

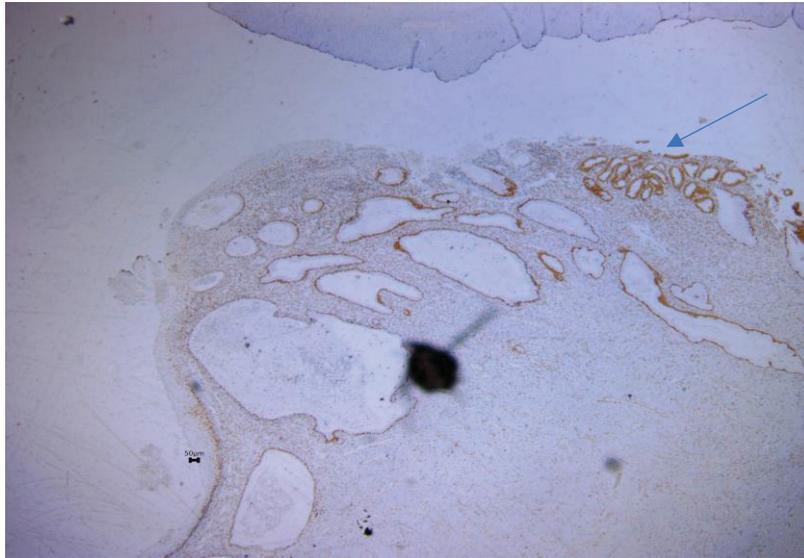
Fig. b

MICROFOTOGRAFIA COM AUMENTO DE 400X

Observa-se a presença da imuno marcação nuclear na glândula normal e no adenocarcinoma *in situ* (coloração marrom).

FONTE: Patrícia Pereira Pinto (2024)

FIGURA 14 - VISÃO PANORÂMICA DO EPITÉLIO GLANDULAR NORMAL E O ADENOCARCINOMA *IN SITU* (seta) NA IMUNOHISTOQUÍMICA COM GEMININA.



FONTE: Patrícia Pereira Pinto (2024)

A associação do desfecho da pesquisa com as variáveis qualitativas foi realizada pelo teste de Fisher, como pode ser observado nas tabelas 3 e 4.

A tabela 3 apresenta os resultados da imunomarcção para p16, Ki 67 e geminina e sua relação com a recidiva da doença.

TABELA 3 – RESULTADO DA ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS BIOMARCADORES P16, KI67 E GEMININA E RECIDIVA DA DOENÇA

Variável	Classe	Livre		Recidiva		p-valor
		Número	Freq. (%)	Número	Freq. (%)	
p16	positivo	24	88,89	3	100,00	0,999
	negativo	3	11,11	0	0,00	
Ki67	positivo	26	96,30	3	100,00	0,999
	negativo	1	3,70	0	0,00	
Geminina	positivo	25	92,59	3	100,00	0,999
	negativo	2	7,41	0	0,00	

Nota: Teste exato de Fisher (nível de significância de 5%)

Todos os casos de recidiva foram p16 e Ki 67 positivos. Dentre os casos com seguimento livre de doença 88,89% apresentaram imunomarcação para p16 e 96,30% para Ki 67. Não houve uma diferença significativa, sugerindo que esses marcadores tenham uma importância somente como ferramentas de auxílio diagnóstico nos casos de AIS. No nosso estudo todos os controles internos se mostraram p16 e Ki 67 negativos.

Ao observarmos a geminina, tivemos 100,00% de positividade nos casos com recidiva e 92,59% de positividade naquelas sem recidiva, também não mostrando importância como marcador de prognóstico. Ao contrário do p16 e Ki 67, a geminina não se mostrou útil como ferramenta auxiliar no diagnóstico do AIS, tanto os tecidos de AIS como o controle interno apresentaram uma alta expressão da proteína.

Como o adenocarcinoma *in situ* é um evento de difícil diagnóstico e, mais ainda, de difícil acompanhamento pelos fatores já descritos, as amostras são conseqüentemente pequenas trazendo dificuldades em se atingir resultados estatísticos significativos. Por isso buscou-se nas análises estatísticas a técnica de *Random Over Sampling Examples* (ROSE) que, a partir da distribuição de probabilidade das variáveis da amostra de pesquisa, faz uma simulação em uma amostra artificialmente maior, evitando o erro tipo II. As tabelas 3-1, 4-1, 5-1, fazem uma simulação com essa técnica ROSE.

TABELA 3.1 – RESULTADO DA ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS BIOMARCADORES P16, KI67 E GEMININA E RECIDIVA DA DOENÇA ATRAVÉS DA TÉCNICA ROSE

Variável	Classe	Livre		Recidiva		p-valor
		Número	Freq. (%)	Número	Freq. (%)	
p16	positivo	123	89,13	12	100,00	0,611
	negativo	15	10,87	0	0,00	
Ki67	positivo	123	89,13	12	100,00	0,611
	negativo	15	10,87	0	0,00	
Geminina	positivo	138	100,00	12	100,00	0,999
	negativo	0	0,00	0	0,00	

Nota: Teste exato de Fisher (nível de significância de 5%)

A Imunomarcaco com p16, Ki 67 e geminina não mostrou associao com a recidiva. Podemos analisar a correlao entre o comprometimento das margens da peça do cone e a recidiva da doença nas tabelas 4 e 4.1

TABELA 4 – A CORRELAO ENTRE O COMPROMETIMENTO DAS MARGENS DA PEÇA DO CONE E A RECIDIVA DA DOENÇA

Variável	Classe	Livre		Recidiva		p-valor
		Número	Freq. (%)	Número	Freq. (%)	
Margem ectocervical	Comprometida	2	8,70	1	33,33	0,3188
	Livre	21	91,30	2	66,67	
Margem endocervical	Comprometida	4	16,67	2	66,67	0,1145
	Livre	20	83,33	1	33,33	

Nota: Teste exato de Fisher (nível de significância de 5%)

As margens endocervicais se mostraram positivas com maior frequência. Dentre as pacientes sem recidiva, 8,70% apresentaram margens ectocervicais comprometidas e 16,67% margens endocervicais comprometidas enquanto as pacientes com recidiva apresentaram 33,33% de margens ectocervicais comprometidas e 66,67% de margens endocervicais comprometidas.

TABELA 4.1- - A CORRELAO ENTRE O COMPROMETIMENTO DAS MARGENS DA PEÇA DO CONE E A RECIDIVA DA DOENÇA ATRAVÉS DA TÉCNICA ROSE

Variável	Classe	Livre		Recidiva		p-valor
		Número	Freq. (%)	Número	Freq. (%)	
Margem ectocervical	Comprometida	0	0,00	7	58,33	<0,001
	Livre	138	100,00	5	41,67	
Margem endocervical	Comprometida	0	0,00	12	100,00	<0,001
	Livre	138	100,00	0	0,00	

Nota: Teste exato de Fisher (nível de significância de 5%)

Apesar de observarmos uma maior frequência de comprometimento das margens nas pacientes com recidiva, não se observou uma associao significativa. Esses valores se tornam estatisticamente significativos quando utilizamos o método

ROSE, mostrando o impacto das margens comprometidas na recidiva de doença, principalmente o comprometimento da margem endocervical.

A tabela 5 mostra a relação volume do cone, idade ao diagnóstico e tempo de seguimento e sua associação com a recidiva.

TABELA 5 – IDADE, VOLUME CONE, TEMPO DE SEGUIMENTO E RISCO DE RECIDIVA

Variável (n°)	Classe	Média (DP)	Mediana (IIQ)	Mín-máx	p-valor
Idade ao diag (30)	Livre (27)	<i>34,85 (6,9)</i>	34 [31-38]	24-29	0,406
	Recidiva (3)	<i>31,33 (7,09)</i>	30 [27,5-34,5]	25-39	
Volume do cone (22)	Livre (19)	8,03 (7,16)	<i>5,26 [3,66-8,41]</i>	1,63-28,8	0,160
	Recidiva (3)	3,61 (2,94)	<i>2 [1,91-4,5]</i>	1,82-7	
Tempo seguimento (30)	Livre (27)	24,26 (28,82)	<i>16[8,24]</i>	2-134	0,044
	Recidiva (3)	68,67 (65,62)	<i>38 [31-91]</i>	24-144	

Nota: IIQ= Intervalo Interquartil (1 e 3 quartil)

DP= Desvio padrão

Itálico: Medida descritiva preferencial para interpretação de acordo com a distribuição da variável

p-valor= Teste de Mann-Whitney (nível de significância de 5%)

Tempo seg= Tempo de seguimento medido em meses.

Idade ao diag= Idade ao diagnóstico

Não se observou uma diferença de idade significativa entre as pacientes com recidiva e livres da doença. Pode-se observar uma mediana de idade ao diagnóstico de 30 anos nas pacientes com recidiva, idade mínima de 27,5 e máxima de 34,5 anos enquanto nas sem recidiva uma mediana de 34 anos, mínima de 31 e máxima de 38 anos. Com relação ao volume de cone menores volumes se mostraram mais associados à recidiva da doença e pacientes com seguimento mais longo apresentaram uma maior chance de recidiva.

TABELA 5.1 – IDADE, VOLUME CONE, TEMPO DE SEGUIMENTO E RISCO DE RECIDIVA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ROSE (CONTINUA)

Variável (n°)	Classe	Média (DP)	Mediana (IIQ)	Mín-máx	p-valor
Idade ao diag (150)	Livre (138)	<i>33,23 (6,16)</i>	33,32 [29,53-36,7]	18,23- 49,67	0,576
	Recidiva (12)	<i>34,97 (10,29)</i>	37,09[26,98-39,45]	19,99- 48,96	
Volume do cone (150)	Livre (138)	11,33 (10,8)	<i>9,29 [3,49-19,47]</i>	38,2	<0,001
	Recidiva (12)	1,89 (0,11)	<i>1,91 [1,81-1,97]</i>	-11,04- 1,7-2,08	

Tempo seguimento (150)	Livre (138)	15,73 (7,54)	<i>14,81</i> [10,82-20,41]	-3,03- 32,83	0,008
	Recidiva (12)	26,52(11,61)	<i>29,87</i> [22,69-32,28]]	2,87- 42,04	

Nota: IIQ= Intervalo Interquartil (1 e 3 quartil)

DP= Desvio padrão

Itálico: Medida descritiva preferencial para interpretação de acordo com a distribuição da variável

p-valor= Teste de Mann-Whitney (nível de significância de 5%)

Tempo seg= Tempo de seguimento medido em meses.

Idade ao diag= Idade ao diagnóstico

As variáveis que obtiveram um nível de significância de até 20% nas análises bivariadas foram analisadas nesse modelo de regressão logística múltiplo, onde pudemos avaliar o impacto desses fatores na recidiva. Através desse modelo obtivemos estimativas de razão de chance (OR) que mostraram que tanto o volume como o tempo de seguimento se mostraram relacionados à recidiva.

TABELA 6-REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA PARA O DESFECHO RECIDIVA

Variáveis	Coef.	OR	IC95% Coef.	p-valor
(intercept)	-4,782	0,008	(<0,001-0,054)	<0,001
Volume do cone	-0,131	0,878	(0,783-0,960)	0,011
Tempo seg	0,149	1,160	(1,074-1,280)	<0,001

Nota: Teste de Wald (nível de significância de 5%)

Distribuição= binomial (Ref. recidiva)

Função de ligação=log

OR= Odds ratio

Tempo seg=Tempo de seguimento

O tempo se mostrou o preditor mais significativo para recorrência. A cada aumento de uma unidade de tempo de seguimento a chance de se diagnosticar a recidiva aumenta em 16,0% e a cada aumento de 01 unidade de volume do cone a chance da paciente ter recidiva diminui em 12,2%.

10 DISCUSSÃO

Marcadores como o p16, Ki 67 e a geminina têm mostrado uma forte relação entre a progressão do ciclo celular e o prognóstico de diferentes neoplasias como a pulmonar, renal, ovariana e de mamas. No carcinoma mamário, por exemplo, o Ki 67 é utilizado de rotina para avaliar o prognóstico e a melhor terapêutica, enquanto a geminina é considerada um marcador independente de prognóstico. No carcinoma de colo uterino há poucos trabalhos sobre a importância prognóstica destes marcadores e a grande maioria aborda as lesões escamosas. Nos estudos de Yan Tu *et al.* (2022) e Wu *et al.* (2024), o Ki67 se mostrou associado à recidiva do CEC, enquanto Nicolás *et al.* (2020) evidenciaram que o p16 negativo parece se associar a um pior prognóstico no carcinoma escamoso. Cardoso *et al.* (2013) sugeriram que uma maior expressão de p16 era vista nas mulheres com recidiva pós cone por NIC 3. Já Kuku *et al.* (2015) não encontrou relação entre a expressão do Ki67 e GMN com o prognóstico do carcinoma de colo. Alguns estudos mostram também a relação destes marcadores com a progressão da lesão intraepitelial de baixo para alto grau (NEGRI *et al.*, 2011; MIYAMOTO *et al.*, 2015); DING *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020; e CARDOSO *et al.*, 2013).

O presente estudo não identificou valor dos marcadores p16, Ki 67 e da geminina como preditores de recidiva. A expressão dessas proteínas se mostrou elevada em todos os casos, independente do desfecho. Todas as recidivas se mostraram positivas para p16 e Ki 67 enquanto as pacientes sem recidiva apresentaram 88,89% de positividade para p16 e 96,30% de positividade para Ki 67. O mesmo se observou com a geminina, 100% das recidivas se mostraram positivas para geminina enquanto as pacientes sem recidiva apresentaram 92,59% de positividade para geminina.

Apesar do p16 e Ki 67 não terem apresentado relevância como marcadores de prognóstico, eles mostraram importância no auxílio diagnóstico. Dois casos com diagnóstico inicial de AIS foram excluídos após a imunohistoquímica se mostrar negativa para p16 e Ki 67, eles foram reclassificados como hiperplasia glandular. Todos os controles internos de tecido glandular normal se mostraram negativos para

esses marcadores. Já a geminina não mostrou utilidade no auxílio diagnóstico. Diferentemente dos estudos com lesões escamosas que evidenciaram sua importância na diferenciação de lesões de baixo e alto grau/ câncer (BAGDE, 2024; XING, 2017), ela mostrou uma positividade elevada nos tecidos glandulares normais do controle interno e no AIS. A combinação do p16 e Ki 67 como ferramentas de auxílio diagnóstico pode ser útil em alguns casos, particularmente nos raros casos de adenocarcinomas *in situ* HPV- não associados (p16 negativos).

Importante ressaltar que os critérios usados para interpretação imunohistoquímica no tecido glandular variam muito entre os estudos e essa falta de padronização torna mais difícil a avaliação de sua importância. Em 2018 foi estabelecida uma padronização de avaliação do p16 em epitélio glandular pela associação britânica de patologistas em ginecologia (SINGH, 2018), sendo definida a positividade como a presença da imunomarcção forte e em bloco, falta ainda estabelecer um ponto de corte para o Ki 67. Pelo que pudemos observar, a geminina apresenta com uma alta positividade em epitélios glandulares normais e patológicos, provavelmente apresentando uma importância maior no epitélio escamoso como ferramenta diagnóstica e/ou prognóstica.

Essa amostra apresentou 03 casos de AIS p16 negativo, destes, 02 se mostraram negativos para GMN também e 01 para Ki67, poderíamos interpretar esse dado como uma falha na imunomarcção causada por dano do material provavelmente no processo de armazenamento. A imunohistoquímica é um procedimento simples e de baixo custo, porém os resultados são dependentes de uma série de fatores como o processamento do bloco cirúrgico, seu tempo de estocagem, a existência de diferentes anticorpos primários e diferentes protocolos de revelação e a variabilidade de interpretação inerente ao método. Nosso estudo trabalhou com blocos armazenados por períodos que variaram de 3 meses a 16 anos e foram processados em 3 centros distintos, o que provavelmente interferiu nos resultados encontrados.

Estudos na literatura evidenciam uma idade entre 30 e 40 anos ao diagnóstico do adenocarcinoma *in situ*, nossa amostra apresentou uma idade média de 34,5 anos, variando de 24 a 49 anos, sendo 44% das pacientes nulíparas à época do diagnóstico. Esses dados corroboram uma abordagem terapêutica mais conservadora para

preservação da fertilidade. Não se observou diferença estatística com relação à idade das pacientes e a recidiva.

O presente estudo mostrou que as citologias de encaminhamento se mostraram relevantes em 85,72% dos casos, sendo 21,43% AGC, 21,43% AIS e 42,86% HSIL. Apesar de evidenciarem lesões de alto grau, somente 21,43% traziam diagnóstico de AIS e 21,43% de AGC, reforçando os dados de literatura que apontam a citologia como um teste de pouca sensibilidade para a doença glandular (COSTA *et al.*, 2012; LASHMANOVA *et al.*, 2022).

Indo em direção oposta ao que fala a literatura, as colposcopias analisadas apresentaram achados maiores em 86,21% dos casos e menores em 10,34% dos casos. Somente 3,45% das colposcopias não evidenciaram lesão. Costa *et al.* (2007) analisaram que a inadequação da colposcopia no reconhecimento de lesões glandulares implica que a biópsia acabe não sendo um bom método diagnóstico, mas não foi o que observamos no nosso estudo. Nossas avaliações colposcópicas apresentaram lesões maiores em 86% dos casos e nossas biópsias mostraram uma boa correlação com o diagnóstico final, sendo 72% indicativas de AIS. Isso pode sinalizar uma boa capacitação dos profissionais que trabalham em ambientes universitários e um conhecimento cada vez maior das lesões glandulares. A terminologia colposcópica definida pela Federação Internacional de Colposcopia e Patologia Cervical- IFCCPC não inclui parâmetros relacionados a neoplasias glandulares cervicais, no entanto, em 1999 uma série de imagens mostraram uma importante relação com a patologia glandular (DUBUC-LISSOIR, 1999).

A partir daí, Machado *et al.* (2022), sugeriram que colposcopistas treinados na detecção de 3 imagens mais associadas ao AIS (vilos aceto brancos com bordos invaginados fundidos ou não; atipias vasculares dentro da área de epitélio glandular e glândulas dilatadas agrupadas) poderiam levar à melhora na performance colposcópica e diminuir a incidência da lesão invasiva, o adenocarcinoma, não deixando de considerar que a lesão glandular pode ser invisível à colposcopia pois pode se encontrar dentro do canal ou na profundidade das criptas.

Vários estudos sobre o adenocarcinoma *in situ* tratado com conização enfatizaram o *status* das margens da peça cirúrgica para definir se a excisão local

seria suficiente como tratamento definitivo. A grande maioria mostrou o comprometimento das margens como fator importante de recidiva da doença. Nossos resultados confirmam o que a literatura aponta. Evidenciamos que a positividade das margens se mostrou associada a um maior risco de recidiva, principalmente quando a margem comprometida era a endocervical. Encontramos 66,67% de recidiva quando a margem endocervical se mostrava comprometida e 33,33% quando margem ectocervical comprometida. Quando trabalhados os dados na metodologia ROSE esses valores se mostraram estatisticamente significativos.

Belkic *et al.* (2022) descrevem um risco 7 vezes maior de recorrência após cones com margens comprometidas se comparadas aos com margem livres, Baskota *et al.* (2021) encontraram 47,2% persistência/recorrência naquelas com margens comprometidas e 9,3% nas com margens negativas, enquanto Costa *et al.* (2007) evidenciaram persistência/ recorrência em 65% das pacientes que tinham margens comprometidas e 19% daquelas com margens livres. Os mesmos autores em 2012 realizaram um estudo de coorte com 166 pacientes onde observou que 41,2% das mulheres com margens comprometidas apresentaram recidiva/ lesão residual e 11,6% daquelas com margens livres também apresentaram.

Salani *et al.* (2008) em uma metanálise com 1278 mulheres submetidas a conização por AIS demonstrou uma recorrência de 19,4% em mulheres com margem positiva e 2,6% com margens negativas. Importante ressaltar que mesmo com margens negativas a paciente tratada com conização ainda se encontra sob risco aumentado de recidiva (BELKIC *et al.*, 2022), nosso estudo mostra 01 caso com margens endocervicais e ectocervicais negativas que apresentou recidiva após 12 anos da cirurgia. Costales *et al.* (2013) encontraram 13,5% de doença residual em histerectomia de pacientes com cones com margens livres. A literatura é unânime em recomendar repetidas conizações em caso de margens comprometidas, até que margens negativas sejam obtidas.

Nossa amostra evidenciou que o volume do cone se mostrou associado ao prognóstico, volumes maiores apresentaram menor risco de recidiva. Apesar de não termos correlacionado volume de cone com comprometimento de margens, essa pode ser uma explicação, volumes maiores tendem a margens livres, assim como uma maior possibilidade de se atingir as lesões saltadoras. Baalbergen *et al.* (2014), em

uma revisão sistemática, não encontraram relação entre o volume do cone e prognóstico. Esses achados, no entanto, devem ser interpretados com cautela. A maneira ideal de se dimensionar o volume do cone é antes da fixação em formaldeído (o formol modifica o tamanho original), através da imersão do espécime em um cilindro graduado usando a técnica de deslocamento de fluido de Arquimedes (CARCOPINO *et al.*, 2017).

Nosso estudo calculou o volume através da multiplicação dos diâmetros ântero posterior e látero-lateral do cone e posteriormente multiplicação da altura, como o fez Kyrgiou *et al.* (2015), com medidas realizadas após a fixação da peça em formol. A literatura não tem um consenso sobre como fazer a medida do cone e a maioria dos trabalhos é retrospectivo. Várias fórmulas matemáticas são usadas: para volume de cone, volume de hemi elipsoide, volume de cilindro e volume de paralelepípedo (CARCOPINO *et al.*, 2017), o que torna a comparação entre os resultados dos estudos mais difícil.

A associação entre a quantidade de tecido excisado e os eventos adversos é bem estabelecida. Sequelas obstétricas como prematuridade extrema, trabalho de parto prematuro, RPMO, corioamnionite, baixo peso ao nascimento, internação e óbito neonatal estão diretamente relacionadas ao volume do cone. As taxas de cerclagem se mostraram também mais elevadas nas mulheres submetidas a tratamento excisional para NIC/AIS. O risco se mostrou 2 vezes maior para excisões com profundidade maior que 10 milímetros, 3 vezes maior para excisões com profundidade maior que 15 milímetros e 5 vezes maior para aquelas maiores que 20 milímetros (KYRGIU *et al.*, 2017), e 2,25 vezes maior para volumes de cone inferiores a 6 cm³ e 13,9 vezes maior para cones com volumes superiores a 6 cm³ (KYRGIU *et al.*, 2016). Sendo assim, deve-se ter cautela nas conizações, buscando-se adaptar o tamanho das excisões de forma a eliminar a doença sem aumentar a morbidade.

Em nossa amostra 10% evoluíram com recidiva, resultado compatível com outros autores que encontraram taxas de 14,3% (BELKIC *et al.*, 2022), 12,6% (COSTA *et al.*, 2012) e 5% (BAALBERGEN *et al.*, 2014). Observamos uma grande dificuldade no seguimento pós-operatório destas pacientes, há uma grande perda no seguimento após as primeiras consultas. Todos os consensos sobre o seguimento de pacientes com AIS em cone são unânimes em enfatizar a importância da adesão da paciente ao

seguimento pós cirúrgico, sendo que os protocolos mais modernos sugerem acompanhamento anual indefinidamente, sendo inclusive o acompanhamento prolongado um dos critérios para se permitir a conização como tratamento definitivo no AIS. Nossas diretrizes preconizam um seguimento de 5 anos e após esse período uma manutenção com citologia a cada 3 anos. Nossa recidiva mais tardia foi após 12 anos de cirurgia e essa paciente apresentava margens endocervicais e ectocervicais livres de doença.

O presente estudo evidenciou que o tempo de seguimento se mostrou uma importante variável relacionada ao diagnóstico de recidiva. Nas pacientes livres de recidiva a mediana de acompanhamento foi de 16 meses enquanto naquelas com recidiva a mediana foi de 38 meses. A cada aumento de 01 unidade de tempo a chance de se diagnosticar uma recidiva aumentou 16%. Isso nos leva a pensar nas estratégias de saúde pública para acompanhamento dessas mulheres, ponderando a adoção de seguimento ao longo de toda a vida como preconizam as sociedades Italiana, Americana e Australiana. As pacientes devem ser fortemente encorajadas a aderir ao seguimento.

Uma questão importante com relação ao tratamento conservador do AIS é o fato de que no Brasil o seguimento é realizado com citologia e colposcopia, o que, de acordo com a literatura, são métodos com baixa sensibilidade diagnóstica (COSTA *et al.*, 2012). A grande maioria dos estudos demonstra que a persistência do HPV após a conização é o melhor preditor independente de recidiva de AIS (BELKIC *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2012), e que a associação do HPV- HR com a citologia traz muitas vantagens para o acompanhamento das mulheres com AIS tratadas com cone (COSTA *et al.*, 2007). Também podemos levar esses dados para as estratégias de saúde pública. Com a aquisição do teste de HPV, agora a ser implantado no Sistema Único de Saúde (SUS), podemos utilizá-lo como rotina no seguimento destas pacientes, melhorando assim a sensibilidade na detecção da recidiva.

O presente estudo apresentou algumas limitações. O tamanho amostral pequeno pode ser explicado pela menor prevalência da doença e pela dificuldade no diagnóstico do AIS, sendo a maioria das lesões já diagnosticadas na sua forma invasiva, o adenocarcinoma. Outras limitações foram ser um estudo retrospectivo, pois a baixa prevalência da doença tornaria inviável o estudo prospectivo no prazo de

2 anos e o uso de material histológico de 3 diferentes centros, muitas vezes com processamentos diferentes, o que provavelmente impactou a negatividade de algumas marcações na imunohistoquímica.

O presente trabalho é o primeiro a avaliar em uma população exclusiva de adenocarcinoma *in situ* com margens cirúrgicas conhecidas o valor prognóstico do p16, Ki 67 e da geminina. Nosso trabalho teve vários pontos fortes, um deles foi a homogeneidade da amostra. Trabalhamos com mulheres com diagnóstico de AIS, submetidas à conização e que tiveram seguimento, não foram incluídos casos de CEC ou adenocarcinoma ou aquelas que evoluíram com HT em período inferior a 6 meses. Também houve padronização na preparação da imunohistoquímica, todas as lâminas foram preparadas por um mesmo técnico do departamento de anatomia patológica do CHC- UFPR, obedecendo a um procedimento operacional padrão do serviço. Os marcadores foram de mesma marca e mesmo lote para todos os casos e um protocolo de interpretação foi definido para cada marcador e utilizados de forma cega por 2 patologistas experientes de centros universitários. A quase totalidade de casos foi concordante, os poucos casos onde não houve concordância o diagnóstico mais grave foi considerado. Outro fator de força do trabalho foi o tempo de seguimento com uma mediana de 20 meses.

Nossos achados devem ser considerados no contexto das limitações desta pesquisa, reconhecemos que nosso estudo é limitado devido ao pequeno número de casos e nenhuma conclusão definitiva pode ser desenhada.

11 CONCLUSÕES

- O p16 e o Ki 67 apresentaram importância no auxílio diagnóstico do AIS mas não se mostraram importantes como marcadores de prognóstico.
- A geminina não se mostrou útil no auxílio diagnóstico ou como marcador de prognóstico.
- Somente 21,43% das citologias de encaminhamento apresentaram diagnóstico de adenocarcinoma in situ, confirmando sua baixa sensibilidade.
- A colposcopia se mostrou um instrumento importante na identificação de lesões, sendo que 86,21% apresentaram achado maior e 72% das biópsias trouxeram o diagnóstico de adenocarcinoma in situ.
- Margens comprometidas estão associadas a recidiva, principalmente quando o comprometimento é das margens endocervicais.
- A idade ao diagnóstico não mostrou correlação com recidiva.
- Volumes maiores de cone se mostraram associados a menor recidiva
- Pacientes seguimento mais prolongado apresentaram mais diagnóstico de recidiva, isso se deve provavelmente à latência do vírus e mostra a importância de um seguimento prolongado nestas mulheres.

12 PERSPECTIVAS FUTURAS

O diagnóstico do adenocarcinoma *in situ* é desafiador. A citologia e a colposcopia atualmente utilizadas na propedêutica diagnóstica apresentam baixa sensibilidade e especificidade. Sendo o HPV um teste mais sensível, considerado o maior preditor independente de recidiva, talvez se justifique seu uso de rotina no seguimento das mulheres com AIS tratadas com conização, principalmente agora que foi incorporado aos exames do Sistema Único de Saúde. O p16, que já tem seu uso bem estabelecido nas lesões escamosas conforme o critério LAST, poderia ser incorporado à rotina do epitélio glandular com a finalidade de diferenciar patologias benignas do AIS e adenocarcinoma, já que as lesões benignas que mimetizam neoplasia são muito mais frequentes nas doenças glandulares.

REFERÊNCIAS

- AGRESTI, A. **An Introduction to Categorical Data Analysis**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.
- ANDERSON, L. et al. **Cancer Council Australia**, 2016. Disponível em: <https://www.cancer.org.au/clinical-guidelines/cervical-cancer/cervical-cancer-screening>. Acesso em: 17 fev. 2024.
- BAALBERGEN, A. HELMERHORST, T. J. M. Adenocarcinoma in Situ of the Uterine Cervix- A Systematic Review. 9. ed. **International Journal of Gynecological cancer**: 2014. 1543-1548 p. v. 24
- BAGDE, N. D., BAGDE, M. N., AGRAWAL, S., NAYAK, P., NEGI, S. S., RAJBHAR, S., & HUSSAIN, N. Role of Geminin as a tool for augmenting accurate diagnosis of cervical neoplasia. **Cureus** 16(3): e56864. DOI 10,7759/cureus.56864
- BASKOTA, S. U.; WANG, T.; ZHAO, C. Follow-up findings in post conservative treatment surveillance for women with cervical adenocarcinoma in situ.1. ed. **Journal of Lower Genital tract Disease**: 2021. 38-42 p. v. 25.
- BELKIĆ, K., ANDERSSON, S., ALDER, S., MINTS, M., & MEGYESSI, D. Predictors of treatment failure for adenocarcinoma in situ of the uterine cervix: Up to 14 years of recorded follow-up. **Oncology Letters** 24: 357, 2022. DOI: 10.3892/ol.2022.13477
- BORNSTEIN J, BENTLEY J, BÖSZE P, GIRARDI F, HAEFNER H, MENTON M. IFCCPC colposcopic nomenclature Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, et al. (2012a). 2011 Colposcopic terminology of the International Federation for Cervical **Pathology and Colposcopy**. **Obstet Gynecol**. 120(1):166–72. 10.1097/AOG.0b013e318254f90c
- BRASIL. **Ministério da Saúde.Instituto Nacional do Câncer**. INCA -2022
- BRASIL. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero- 2a edição, revista, ampliada e atualizada**. Disponível em:http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/controle_cancer. Acesso em: 24 de novembro 2023
- CARCOPINO, X., MANCINI, J., PRENDIVILLE, W., GONDROY, J., CHEVREAU, J., LAMBLIN, G., ... & PREAUBERT, L. The Accuracy of Large Loop Excision of the Transformation Zone Specimen Dimensions in Determining Volume: A Multicentric Prospective Observational Study. **Journal of Lower Genital Tract Disease**: 21, 2, 120-124. 2017
- CARDOSO, F. A., CAMPANER, A. B., & SILVA, M. A. L. G. Prognostic value of p16INK4a as a marker of clinical evolution in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3) treated by cervical conization Prognostic value of p16INK4a as a marker of clinical evolution in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade

3 (CIN 3) treated by cervical conization. **Acta pathologica, microbiologica e immunologica scandinavica**: 122: 192-199. 2013

CASTANON, A; LANDY, R. SASIENI P. D. Is Cervical screening preventing adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the cervix? **International Journal of Cancer**: 139, 1040-1045 (2016)

CASTELLSAGUÉ, X., DÍAZ, M., DE SANJOSÉ, S., MUÑOZ, N., HERRERO, R., FRANCESCHI, S., ... & BOSCH, F. X. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. **Journal of the National Cancer Institute**, 2006; 98(5): 303-315.

CIAVATTINI, A., GIANNELLA, L., CARPINI, G. D., TSIROGLOU, D., SOPRACORDEVOLE, F., CHIOSSI, G., ... & OF COLPOSCOPY, I. S. Adenocarcinoma in situ of the uterine cervix: Clinical practice guidelines from the Italian society of colposcopy and cervical pathology (SICPCV). **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**: 240:2019; 273-277 p.

CLINTON, L. K. The LAST Guidelines in Clinical Practice. 144. ed. **Am J Clin Pathol**: 2015. v.144: 844-849 p.

COHEN, P. Excisional treatment comparison for in situ endocervical adenocarcinoma (EXCISE): A phase 2 pilot randomized controlled trial to compare histopathological margin status, specimen size and fragmentation after loop electrosurgical excision procedure and cold knife cone biopsy. **Gynecologic oncology**: 2020.

COSTA, S., NEGRI, G., SIDERI, M., SANTINI, D., MARTINELLI, G., VENTUROLI, S., ... & PELUSI, G. Human papillomavirus (HPV) test and PAP smear as predictors of outcome in conservatively treated adenocarcinoma in situ (AIS) of the uterine cervix. **Gynecologic Oncology** 106 (2007) 170-176 p.

COSTA, S., VENTUROLI, S., ORIGONI, M., PRETI, M., MARIANI, L., CRISTOFORONI, P., & SANDRI, M. T. Performance of HPV testing in the follow-up after treatment of high-grade cervical lesions, adenocarcinoma in situ (AIS) and microinvasive carcinoma. **ecancer** 2015, 9:528

COSTA, S., VENTUROLI, S., NEGRI, G., SIDERI, M., PRETI, M., PESARESI, M., ... & SYRJÄNEN, K. Factors predicting the outcome of conservatively treated AIS of the uterine cervix: An analysis of 166 cases. **Gynecologic Oncology**, 124 (2012) 490-495 p.

COSTALES, A. B., MILBOURNE, A. M., RHODES, H. E., MUNSELL, M. F., WALLBILLICH, J. J., BROWN, J., ... & SCHMELER, K. M. Risk of residual disease and invasive carcinoma in women treated for adenocarcinoma in situ of the cervix. **Gynecologic oncology**: 2013. v.129 .513-516 p.

DING, L., SONG, L., ZHAO, W., LI, X., GAO, W., QI, Z., & WANG, J. Predictive value of p16, Ki67 and Pro-ExC immuno-qualitative features in LSIL progression into HSIL. **Experimental and Therapeutic medicine** 19: 2457-2466, 2020.

DUBUC-LISSOIR, J., EHLEN, T., HEYWOOD, M., & PLANTE, M. Guidelines on adenocarcinoma in situ of the cervix: clinical features and review of management. *n* 77. Jun 1999. 699-706 p.

GIANNELLA, L., DI GIUSEPPE, J., DELLI CARPINI, G., GRELLONI, C., FICHERA, M., SARTINI, G., ... & CIAVATTINI, A. HPV-negative adenocarcinomas of the Uterine Cervix: from molecular characterization to clinical implications. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022, 23, 15022.

GONZALEZ, M. A., TACHIBANA, K. E. K., CHIN, S. F., CALLAGY, G., MADINE, M. A., VOWLER, S. L., ... & COLEMAN, N. Geminin predicts adverse clinical outcome in breast cancer by reflecting cell-cycle progression. **Journal of Pathology**. 2004;204: 121-130

HARUKI, T *et al*. Geminin expression in small lung adenocarcinomas: implication of prognostic significance. **Lung cancer**: Elsevier, 2011. 356-362 p. v. 71.

HEPLER T.K.; DOCKERLY M.B.; RANDALL L.M. Primary adenocarcinoma of the cervix. **Am J Obstet Gynecol** 1952; 63: 800-8

HOUGHTON, O., JAMISON, J., WILSON, R., CARSON, J., & MCCLUGGAGE, W. G. p16 Immunoreactivity in unusual types of cervical adenocarcinoma does not reflect human papillomavirus infection. **Histopathology** 2010, 57, 342-350.

HUANG, K *et al*. p16 expression in patients with cervical cancer and its prognostic significance: meta-analysis of published literature. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. 2014. 64-69 p. v. 183.

ISHIKAWA, M., NAKAYAMA, K., NAKAMURA, K., YAMASHITA, H., ISHIBASHI, T., MINAMOTO, T., ... & KYO, S. P16INK4A expression might be associated with a favorable prognosis for cervical adenocarcinoma via dysregulation of the RB pathway. **Scientific Reports**, 2021. 11:18236

JIANG, Y; CHEN, C.; LI, L. Comparison of Cold-Knife Conization versus Loop Electrosurgical Excision for Cervical Adenocarcinoma In Situ (ACIS) : A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One**. 2017; 12(1): e0170587.

JORDAN, J., ARBYN, M., MARTIN-HIRSCH, P., SCHENCK, U., BALDAUF, J. J., DA SILVA, D., ... & PRENDIVILLE, W. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for clinical management of abnormal cervical cytology, part 1. **Cytopathology**: 2008, 19, 342-354 p.

KANTHIYA, K., KHUNNARONG, J., TANGJITGAMOL, S., PURIPAT, N., & TANVANICH, S. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, 17 (7), 3201-3206. 2016.

KYRGIU, M., VALASOULIS, G., STASINO, S. M., FOUNTA, C., ATHANASIOU, A., BENNETT, P., & PARASKEVADIS, E. Proportion of cervical excision for cervical

intraepithelial neoplasia as a predictor of pregnancy outcomes. **Int J Gynecol Obstet** 2015; 128:141-7

KYRGIU, M., ATHANASIOU, A., PARASKEVAIDI, M., MITRA, A., KALLIALA, I., MARTIN-HIRSCH, P., ... & PARASKEVAIDIS, E. Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal** 2016; 354: i3633.

KYRGIU, M., ATHANASIOU, A., KALLIALA, I. E., PARASKEVAIDI, M., MITRA, A., MARTIN-HIRSCH, P. P., ... & COCHRANE GYNAECOLOGICAL, NEURO-ONCOLOGY AND ORPHAN CANCER GROUP. Obstetric outcomes after conservative treatment for cervical intraepithelial lesions and early invasive disease (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews** 2017, Issue 11. Art. No.:CD012847.

KRIVAK, T. C., ROSE, G. S., MCBROOM, J. W., CARLSON, J. W., WINTER III, W. E., & KOST, E. R. Cervical Adenocarcinoma in Situ: A Systematic Review of Therapeutic Options and Predictors of Persistent or Recurrent Disease. 9. ed. **Obstetrical and Gynecological survey**: 2001. 567-575 p. v. 56.

KUKU, S., PROCTOR, I., LODDO, M., KADALAYIL, L., KHOSHZABAN, M., LEDERMANN, J., & MCCORMACK, M. Do cell- cycle phase-specific markers predict disease grade, stage and outcome in cervical carcinoma? 6. ed. **International Journal of Gynecological Cancer**: 2015. 1066-1072 p. v. 25.

KUSHWAHA, P. P., RAPALLI, K. C., & KUMAR, S. Geminin is a multi-task protein involved in cancer pathophysiology and developmental process: a review. **Biochimie** (2016), 131. 115-127

LASHMANOVA, N., BRAUN, A., CHENG, L., GATTUSO, P., & YAN, L. Endocervical adenocarcinoma in situ- from Papanicolaou test to hysterectomy: a series of 74 cases. **Journal of the American Society of Cytopathology** 2022. 11, 13-20.

LEE, S., SAHASRABUDDHE, V. V., MENDOZA-CERVANTES, D., ZHAO, R., & DUGGAN, M. A. Tissue-based immunohistochemical Biomarker expression in malignant glandular lesions of the uterine cervix: A Systematic Review. **International Journal of Gynecological Pathology**. 37: 128-140. 2017.

LIN, M., NARKCHAM, S., JONES, A., ARMYLAGOS, D., DIPIETRO, B., OKAFOR, O., ... & OKOYE, E. False negative Papanicolaou tests in women with biopsy-proven invasive endocervical adenocarcinoma/ adenocarcinoma in situ: a retrospective analysis with assessment of interobserver agreement). **J Am Soc Cytopathology** 2022 Jan-Feb;11(1):3-12. doi: 10.1016/j.jasc.2021.08.001. Epub 2021 Aug 9.

LINDSAY, J. K. **Applying Generalized Linear Models**. New York: Springer, 1997.

LODDO, M., KINGSBURY, S. R., RASHID, M., PROCTOR, I., HOLT, C., YOUNG, J., ... & WILLIAMS, G. H. Cell-cycle-phase progression analysis identifies unique phenotypes of major prognosis and predictive significance in breast cancer. **British Journal of Cancer**: 2009. 959-970 p. v. 100.

MACHADO, G F; ALVES, R R Figueiredo; MOREIRA, M A R. Performance of three colposcopy images for the identification of squamous and glandular cervical precursor neoplasias. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 305: 2022. 1319-1327 p.

MARQUES, J. P., COSTA, L. B., DE SOUZA, A. P., DE LIMA, A. F., DUARTE, M. E. L., BARBOSA, A. P. F., & DE MEDEIROS, P. L. Células glandulares atípicas e câncer de colo uterino: revisão sistemática. 99. ed. **Rev Assoc Med Bras**: 2011; 57(2). 234-238 p.

MENARDI, G.; TORELLI, N. **Training and assessing classification rules with imbalanced data**. Data mining and knowledge discovery, 2014, 28: 92-122

MIYAMOTO, S., HASEGAWA, J., MORIOKA, M., HIROTA, Y., KUSHIMA, M., & SEKIZAWA, A. The association between p16 and Ki-67 immunohistostaining and the progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**: 2016. 64-69 p. v. 183.

McCLUGGAGE W. G.; SINGH N.; GILKS C. B. Key changes to the World Health Organization (WHO) classification of female genital tumors introduced in the 5th edition (2020). **Histopathology** 2022, 80, 762–778. DOI: 10.1111/his.14609

MOLIJN, A., JENKINS, D., CHEN, W., ZHANG, X., PIROG, E., ENQI, W., ... & CHINESE HPV TYPING GROUP. The complex relationship between human papillomavirus and cervical adenocarcinoma. **International Journal of cancer**: 138, 2016. 409-416 p.

MUNRO, A., CODDE, J., SPILSBURY, K., STEEL, N., STEWART, C. J., SALFINGER, S. G., ... & COHEN, P. A. Risk of persistent and recurrent cervical neoplasia following incidentally detected adenocarcinoma in situ. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, 2017. 272.e1-272.e7

NEGRI, G., VITTADELLO, F., ROMANO, F., KASAL, A., RIVASI, F., GIRLANDO, S., ... & EGARTER-VIGL, E. P16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. 99. ed. **Virchows Arch**: 2004. v.445, 616-620 p.

NEGRI, G., BELLISANO, G., CARICO, E., FAA, G., KASAL, A., ANTONIAZZI, S., ... & VITTADELLO, F. Usefulness of p16, ProEx and Ki-67 for the diagnosis of glandular dysplasia and adenocarcinoma of the cervix uteri. **International Journal of Gynecological Pathology**: 2011. V. 30. 407-413

NETO, P. L. **Estatística**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2002.

NICOLÁS, I., SACO, A., BARNADAS, E., MARIMON, L., RAKISLOVA, N., FUSTÉ, P., ... & DEL PINO, M. Prognostic implications of genotyping and p16 immunostaining in HPV-positive tumors of the uterine cervix. **Modern Pathology**: 2020. 33: 128-137 p.

PANICKER, R.; MUSTAFA, S. Immunohistochemistry: A valuable tool in the management of common female genital tract tumors- a clinician 's perspective. 139. ed. **J South Asian Feder Obst Gynae** 2021; v.13(2): 131-134.

PARKASH, V., AISAGBONHI, O., RIDDLE, N., SIDDON, A., PANSE, G., & FADARE, O. Recent Advances in the Classification of Gynecological Tract Tumors: Updates From the 5th Edition of the World Health Organization "Blue Book". **Arch Pathol Lab Med.** 2023 Oct 1; 147(10):1204-1216. doi: 10.5858/arpa.2022-0166-RA.

PERKINS, R. B., GUIDO, R. L., CASTLE, P. E., CHELMOW, D., EINSTEIN, M. H., GARCIA, F., ... & SCHIFFMAN, M. ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. **J Low Tract Dis** 2020; 24: 102-131

PETROPOULOU, C., KOTANTAKI, P., KARAMITROS, D., & TARAVIRAS, s. Cdt1 and Geminin in cancer: markers or triggers of malignant transformation? **Frontiers in Bioscience:** 13, 4485-4494 p, 2008.

PINTO P.P; ZANINE R.M. Diagnosis value of p16 and Ki-67 expression in cervical glandular intraepithelial disease: a review. **Annals of diagnostic pathology** 62. 2023.

PRADHAN, D., LI, Z., OCQUE, R., PATADJI, S., & ZHAO, C. Clinical significance of atypical glandular cells in Pap tests: An analysis of more than 3000 cases at a large academic women's center. **Cancer cytopathology:** v 99, 2010. 582-590 p.

R.CORE TEAM. R: **A Language and Environment for Statistical Computing**, 2021

ROYSTON, J. R. Applied Statistics: An Extension of Shapiro and Wilk 's W Test for Normality to Large Samples. 2. ed. London: **Royal Statistical Society**, 1982. 115-124 p. v. 31.

SALANI, R.; PURI, I.; E. BRISTOW, R. Adenocarcinoma in situ of the uterine cervix: a meta-analysis of 1278 patients evaluating the predictive value of conization margin status. 200. ed. **American Journal of Obstetrics & Gynecology:** 2009. 182e1-182e5 p. v. 24.

SCHORGE J.O. p16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** (2004) 190, 668-73.

SIEGEL, S; CASTELLAN, Jr N.J. **Estatística Não-Paramétrica para Ciências do Comportamento.** 2. ed. 2006: Artmed, 2006.

SINGH N.; GILKS C. B.; WONG R. W-C. et al. Interpretation of the immunohistochemistry in Lower Anogenital Tract Neoplasia. **The British Association of Gynecological pathologists.** 2018

Disponível <https://www.bgcs.org.uk/wp-content/uploads/2019/05/BAGP-UKNEQAS-clQC-project-p16-interpretation-guide-2018>, acesso em: 30 de novembro 2023

SOARES L.C.; OLIVEIRA M. A. P. Cervical adenocarcinoma: are we screening and treating patients appropriately? **Journal of Lower genital Tract Disease**. V20, 4, October, 2016.

STOLNICU, S., BARSAN, J., HOANG, L., TERINTE, C., PESCI, A., AVIEL-RONEN, S., ... & SOSLOW, R. International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): A new pathogenetic Kuku et al. (2015) classification for invasive adenocarcinomas of the endocervix. **Am J Surg Pathol**. 2018. February; 42 (2): 214-226.

STOLNICU, S; TALIA K.L; MCCLUGGAGE G. The Evolving Spectrum of Precursor Lesions of Cervical Adenocarcinomas. **Adv Anat Pathol**: 2020. 278-293 p. v.27, n.5.

SWIFT, B. E., WANG, L., JEMBERE, N., & KUPETS, R. Risk of recurrence after treatment for cervical intraepithelial neoplasia 3 and adenocarcinoma in situ of the cervix: Recurrence of CIN 3 and AIS of cervix. **J Low Genit Tract Dis**, v. 24. p 252-258, 2020

TAVARES, M. V.; GOUVEIA, A. Management of adenocarcinoma in situ of the cervix. Adenocarcinoma in situ do colo do útero: experiência de um centro de referência. 99. ed. **Acta Obstet Ginecolo Port**: 2016; 10(2):96-101.

TEOH, D., MUSA, F., SALANI, R., HUH, W., & JIMENEZ, E. Diagnosis and management of adenocarcinoma in situ. A Society of Gynecologic Oncology Evidence-Based Review and Recommendations. **Obstetrics & Gynecology**. 4. ed. Obstetrics & Gynecology: 2020. 869-878 p. v. 135.

TU, Y., JIANG, P., ZHANG, J., JIANG, S., YI, Q., & YUAN, R. The positive threshold of the immunohistochemical parameter Ki67 for predicting the recurrence of cervical cancer. **Int J Gynecol Obstet**.:2022. 330-337. p. v. 158.

WANG, X., ZHAO, Y., ZOU, X., & WANG, L Relationship of p16 and Ki67 in recurrence of HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia. 13. ed. **Int J Clin Exp Pathol**: 2020. 3174-3180 p. v. 12.

WARD L. S. Entendendo o processo da tumorigênese. **Arq Bras Endocrinol Metab** vol 46. n 4. Agosto, 2002

WESTIN, M. C., DERCHAIN, S. F., RABELO-SANTOS, S. H., ANGELO-ANDRADE, L. A., SARIAN, L. O., OLIVEIRA, E., & ZEFERINO, L. C. Atypical glandular cells and adenocarcinoma in situ according to the Bethesda 2001 classification: Cytohistological correlation and clinical implications. 139. ed. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**: 139: 2008. 79-85 p.

WOHLSCHLEGEL, J. A., KUTOK, J. L., WENG, A. P., & DUTTA, A. EXPRESSION of Geminin as a Marker of Cell Proliferation in Normal Tissues and Malignancies. **American Journal of Pathology**, 2002. 161, n1.

WU, J., WANG, R., CHEN, W., WU, Y., & XIAO, L. Immunohistochemical markers Ki67 and p16 help predict prognosis in locally advanced cervical cancer. **European Journal of Obstetrics & Gynecology**: 2024. 210-216 p. v. 294.

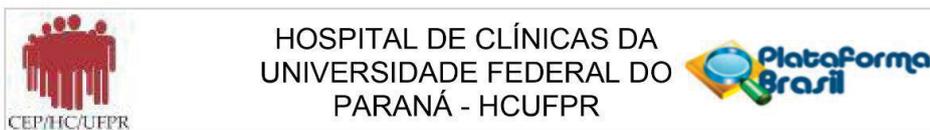
YAGI, T., INOUE, N., YANAI, A., MURASE, K., IMAMURA, M., MIYAGAWA, Y., ... & MIYOSHI, Y. Prognostic significance of geminin expression levels in Ki 67- high subset of estrogen receptor positive and HER2-negative breast cancers. **Breast Cancer** 2014.

XING, Y; WANG, C.; WU, J. Expression of geminin, p16 and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues. **Medicine**. 2017. 96:26 (e7302).

ZHANG, R. C., VUE, N. C., OBASI, L. U., VOGEL, R. I., SUBRAMANIAN, A. T., KHALIFA, M. A., ... & ERICKSON, B. K. Impact of Screening Modality on the detection of Cervical Adenocarcinoma in situ and Adenocarcinoma. **J Low Genit tract Dis**. 2021; 25(4): 267-269 p

ZHENG, Z., YANG, X., YAO, X., & LI, L. **Prognostic value of HPV 16/18 genotyping and geminin mRNA quantification in low-grade cervical squamous intraepithelial lesion**. 2. ed. Bioengineered: Uk, 2021. 11482-11489 p. v. 12.

ANEXO 1- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel dos biomarcadores como preditores de persistência, recidiva e progressão de doença nas mulheres com diagnóstico de AIS submetidas à tratamento conservador.

Pesquisador: Rita Maira Zanine

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 58737222.5.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 17/02/2023

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.928.024

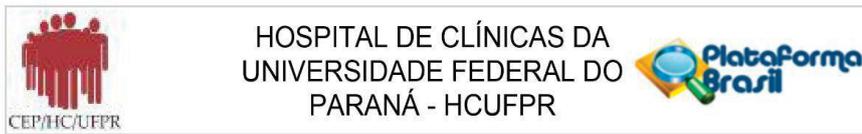
Apresentação da Notificação:

Trata-se de relatório parcial de evolução de estudo. Sobre a pesquisa: Intenciona-se avaliar dentre as pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma in situ de colo submetidas a tratamento conservador (conização) se a presença dos biomarcadores p16, Ki67 e geminina atuam como fatores de prognóstico. Objetiva-se encontrar fatores de risco de recidiva, persistência e progressão de doença e com isso individualizar o tratamento destas mulheres.

Objetivo da Notificação:

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a presença do HPV de alto risco e sua genotipagem e os biomarcadores p16, Ki 67 e geminina nas peças de cone das pacientes submetidas a tratamento conservador após diagnóstico de AIS. A finalidade é avaliar a importância dos mesmos como preditores de doença recorrente, residual ou de progressã

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: 5.928.024

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa será realizada com dados de arquivo- peças cirúrgicas e prontuários

Risco de dano e perda de material

Benefícios:

Proporcionar tratamento mais conservador com segurança.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

As 36 pacientes em estudo não serão afetadas diretamente pela pesquisa pois os dados serão obtidos através de prontuários. Não foi necessário qualquer tipo de indenização ou assistência aos participantes da pesquisa. Foi realizada a publicação de um artigo de revisão a partir da revisão de literatura. O artigo, sob o título: " Diagnostic value of p16 and Ki-67 expression in cervical glandular intraepithelial disease: a review", foi publicado na revista " Annals of Diagnostic Pathology".

Houve necessidade de se buscar parcerias com outros centros visto o adenocarcinoma in situ ser patologia de menor incidência e os casos acompanhados no ambulatório de PTGI da UFPR não terem alcançado o numero amostral calculado. Será realizada parceria com o Instituto Fernandes Figueira, da FIOCRUZ.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

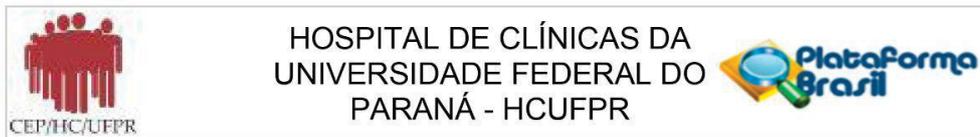
Notificação aprovada.

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 N° 001/2013 do CNS, manifesta -se pela aprovação da Notificação. 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. Manter os documentos da pesquisa 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)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 5.928.024

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	relatparcialwordsemassiform2.docx	17/02/2023 10:23:51	Rita Maira Zanine	Postado
Envio de Relatório Parcial	Relatorioparcialceppdfassinado.pdf	17/02/2023 10:25:28	Rita Maira Zanine	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

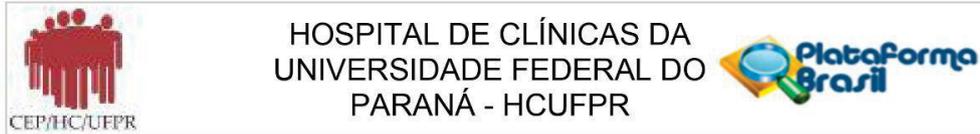
Não

CURITIBA, 06 de Março de 2023

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)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

ANEXO 2- CEP UFPR



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Papel dos biomarcadores como preditores de persistência, recidiva e progressão de doença nas mulheres com diagnóstico de AIS submetidas à tratamento conservador.

Pesquisador: Rita Maira Zanine

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 58737222.5.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.109.326

Apresentação do Projeto:

Segundo os autores "Trata-se de um estudo retrospectivo com análise dos prontuários do serviço de PTGI do Hospital das Clínicas do Paraná- UFPR no período de 2010 a 2020. Todas as pacientes com diagnóstico histológico de adenocarcinoma in situ (AIS) serão estudadas no seguimento pós conização. Serão excluídas aquelas sem seguimento, considerado como período mínimo de 6 meses. Serão avaliados nos blocos de cone a presença ou ausência do DNA-HPV de alto risco e sua genotipagem e dos biomarcadores Ki 67, p16 e Geminina e a evolução destas pacientes para persistência, recidiva ou progressão de doença. Intenciona-se avaliar o perfil da paciente que evolui com clearance ou doença e os fatores associados a essa evolução. Amostra 45 participantes."

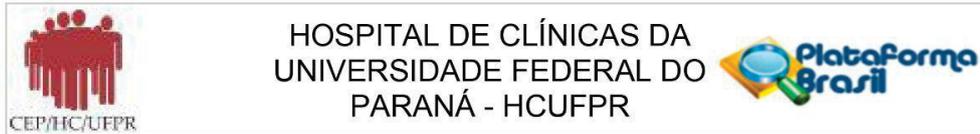
Objetivo da Pesquisa:

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a presença do HPV de alto risco e sua genotipagem e os biomarcadores p16, Ki 67 e geminina nas peças de cone das pacientes submetidas a tratamento conservador após diagnóstico de AIS. A finalidade é avaliar a importância dos mesmos como preditores de doença recorrente, residual ou de progressão

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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: 6.109.326

A pesquisa será realizada com dados de arquivo- peças cirúrgicas e prontuários

Risco de dano e perda de material

Benefícios:

Proporcionar tratamento mais conservador com segurança.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de estudo para TCR Residência médica pelo departamento de tocoginecologia da UFPR.

Essa notificação trata de emenda incluindo novos cenários para pesquisa. O Instituto Fernandes Figueira e o laboratório Jarbas Doles- Goiânia irão colaborar compartilhando os casos de adenocarcinoma in situ da instituição já preparados em lâminas para confirmação do diagnóstico, imuno-histoquímica e genotipagem para HPV.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicitado dispensa de TCLE pois vai trabalhar com amostras arquivadas, sem interferência direta aos pacientes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Analisado a justificativa e é considerada pertinente, portanto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

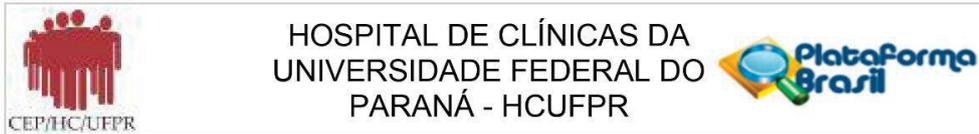
Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Emenda.

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. Manter os documentos da pesquisa 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.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

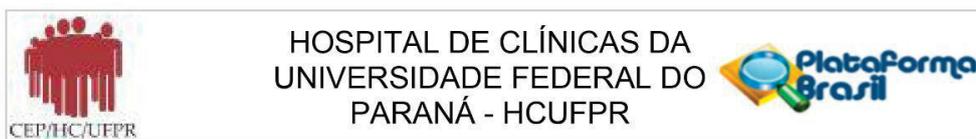
Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 6.109.326

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2091077_E1.pdf	26/05/2023 10:33:39		Aceito
Outros	emenda1qualificacaoword.docx	19/05/2023 18:46:33	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	emenda1qualificacaopdf.pdf	19/05/2023 18:46:17	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	emenda1concordanciaword.docx	19/05/2023 18:45:59	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	emenda1concordanciapdf.pdf	19/05/2023 18:45:30	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracao1participanteJD1word.docx	19/05/2023 18:44:47	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracao1participanteJD1pdf.pdf	19/05/2023 18:44:28	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracao1participanteIFFword.docx	19/05/2023 18:43:57	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracao1participanteIFFpdf.pdf	19/05/2023 18:43:26	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	Emenda1Projeto1PBword1.docx	19/05/2023 18:42:48	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	EmendaProjeto1PBpdf.pdf	19/05/2023 18:40:37	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	1cartaemendaword.docx	19/05/2023 18:39:58	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartaemenda1pdf.pdf	19/05/2023 18:39:34	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartaemenda.docx	19/05/2023 18:13:04	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartarespostapdf.pdf	19/05/2023 18:09:17	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartarespostaword.docx	19/05/2023 18:07:49	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracaoparticipanteJD1.docx	21/04/2023 19:12:27	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracaoparticipanteJD1.pdf	21/04/2023 19:10:25	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracaoparticipanteIFF.docx	21/04/2023 19:06:55	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracaoparticipanteIFF.pdf	21/04/2023 19:05:29	Rita Maira Zanine	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	EmendaProjetoPBword1.docx	21/04/2023 19:03:52	Rita Maira Zanine	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	EmendaProjetoPBword.pdf	21/04/2023 19:00:40	Rita Maira Zanine	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: 6.109.326

Outros	emendaqualificacao.docx	21/04/2023 18:58:54	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	emendaqualificacao.pdf	21/04/2023 18:57:17	Rita Maira Zanine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	emendaconcordancia.docx	21/04/2023 18:51:46	Rita Maira Zanine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	emendaconcordancia.pdf	21/04/2023 18:48:26	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartaemenda.pdf	21/04/2023 18:44:29	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartaemendaword.docx	04/04/2023 16:21:43	Rita Maira Zanine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensaconsentimento.pdf	13/05/2022 18:06:47	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	Ausenciacustos.pdf	13/05/2022 18:05:14	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartaconcordanciaorientador.pdf	13/05/2022 18:04:35	Rita Maira Zanine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	compromissoequipe.pdf	13/05/2022 18:03:22	Rita Maira Zanine	Aceito
Declaração de concordância	concordunidades.pdf	13/05/2022 18:02:43	Rita Maira Zanine	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	cartapesquisador.pdf	13/05/2022 18:02:04	Rita Maira Zanine	Aceito
Folha de Rosto	Frosto.pdf	13/05/2022 18:00:27	Rita Maira Zanine	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 10 de Junho de 2023

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)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br

ANEXO 3 - CEP IFF

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel dos biomarcadores como preditores de persistência, recidiva e progressão de doença nas mulheres com diagnóstico de AIS submetidas à tratamento conservador.

Pesquisador: Rita Maira Zanine

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 58737222.5.3001.5269

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.326.792

Apresentação do Projeto:

As informações referentes à "Apresentação do Projeto", foram obtidas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2159393 de 07/09/2023).

"As doenças glandulares do colo uterino são menos comuns que as doenças escamosas, mas, nas últimas décadas, este diagnóstico vem aumentando. O adenocarcinoma in situ (AIS) é o precursor do adenocarcinoma e o seu diagnóstico precoce e manejo adequado são extremamente importantes para evitar a doença invasiva. Há um intervalo de pelo menos 05 anos entre o AIS clinicamente detectável e a doença invasiva, sugerindo uma ampla oportunidade de screening e abordagem.

No entanto, o diagnóstico das lesões glandulares apresenta limitações. Ao contrário das lesões escamosas, o critério citológico para identificar

neoplasias glandulares não é bem estabelecido e as alterações colposcópicas são pouco elucidativas. Além das dificuldades técnicas, a falta de

critérios citomorfológicos bem definidos para sua

interpretação, o alto grau de variabilidade interobservador e a falta de achados colposcópicos característicos se configuram como obstáculos no seu

diagnóstico. Sendo assim, tanto a citologia como a colposcopia têm um papel menos definido na detecção de lesões precursoras glandulares e na

Endereço: Avenida Rui Barbosa, 716 - Flamengo (Prédio da Genética - Térreo, sala 1)

Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020

UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2554-1991 **E-mail:** cep.iff@fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 6.326.792

diferenciação de lesões precursoras ou invasoras. A prevalência do diagnóstico citológico de AIS ou adenocarcinoma invasor, no Brasil, é menor que 0.01%. Dentre todos os exames considerados satisfatórios, mais de 50% dos casos de AIS coexistem com lesões pré invasivas escamosas ou carcinoma invasivo. Cerca de 48% a 69% das mulheres com laudo citológico sugestivo de AIS tem confirmação histológica da lesão e, destas, 38% apresentam laudo de invasão. Os fatores de risco para AIS são semelhantes àqueles para as doenças cervicais escamosas. Já está estabelecido que a infecção persistente com um tipo oncogênico de HPV é condição necessária para o desenvolvimento das lesões precursoras e das lesões de câncer cervical. O HPV é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) o agente etiológico do câncer do colo uterino, mas o vírus não é suficiente para o aparecimento da lesão. É necessário um conjunto de variáveis relacionadas ao hospedeiro, fatores ambientais e virais. Nos últimos anos, o estudo dos mecanismos genéticos e moleculares implicados na gênese e progressão do câncer, tem permitido obter novos métodos de diagnósticos e de acompanhamento. Os trabalhos tentam encontrar biomarcadores em cada etapa da carcinogênese. Assim sendo, é muito relevante identificar biomarcadores capazes de identificar, dentre as mulheres com infecção persistente pelo HPV, aquelas com risco de desenvolver câncer cervical. Vários biomarcadores foram identificados, cada qual em estágios específicos da história natural da infecção pelo HPV e progressão do câncer cervical. Eles incluem a presença de ácidos nucleicos virais, proteínas virais ou alterações de fatores celulares induzidos por oncoproteínas. Os testes para detecção do HPV são muito estudados e utilizados atualmente. Sua grande vantagem é a alta sensibilidade e o alto valor preditivo negativo, mas tem uma baixa especificidade, já que não podem diferenciar a infecção transitória da persistente. A genotipagem do HPV tem sido incorporada no screening populacional e é utilizada para identificar a agressividade tumoral. Os testes de DNA-HPV de alto risco têm sido estudados como um importante preditor de AIS residual/ recorrente após conização além do estado de comprometimento das margens cirúrgicas. Um biomarcador muito promissor é a imunohistoquímica com p16 e Ki 67. A super

Endereço: Avenida Rui Barbosa, 716 - Flamengo (Prédio da Genética - Térreo, sala 1)
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2554-1991 **E-mail:** cep.iff@fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 6.326.792

expressão do p16 é considerado um marcador de infecção pelo HPV e da ativação da expressão de oncogenes e da desregulação do ciclo celular. Seu uso é muito útil para acurácia diagnóstica e para a qualidade dos diagnósticos histopatológicos. O antígeno Ki 67 tem demonstrado ser um indicador confiável do crescimento tumoral. No entanto, cada um destes marcadores podem também ser expressos em condições não neoplásicas. A técnica de marcação dupla, que inclui ambos Ki-67 e p16, parece apresentar uma maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de lesões e pode vir a representar uma ferramenta importante frente às citologias de AGC com diminuição dos resultados falso negativos ou resultados borderline. Estudos demonstram também uma diferença significativa na expressão de p16-Ki 67 entre os casos de seguimento negativos e positivos mostrando sua utilidade no acompanhamento das doenças glandulares. A geminina é uma proteína envolvida na progressão do ciclo celular e alterações na sua expressão são associadas à proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular. Um grande número de estudos relataram que a geminina representa um papel fundamental na fisiopatologia e no desenvolvimento do câncer, sendo assim um biomarcador promissor na diferenciação de lesões pré malignas e malignas e na predição da progressão das lesões. Yan Xing et al, em um estudo sobre a importância da geminina na discriminação das lesões cervicais de alto grau, evidenciou uma grande sensibilidade e especificidade deste biomarcador sugerindo seu uso junto ao p16 e Ki 67 frente às dificuldades diagnósticas. Estudos vêm sendo realizados sobre o papel dos biomarcadores como preditores de risco, recorrência de doença e de progressão para adenocarcinoma nas pacientes tratadas de forma conservadora para AIS 6-10. Em conjunto com outros preditores como idade, comprometimento de margem cirúrgica, citologias de seguimento, JEC visível à colposcopia e volume do cone, o teste de HPV de alto grau se mostrou um preditor de risco para persistência, recorrência de doença e progressão para invasão. Assim como o diagnóstico das doenças glandulares, que não é bem estabelecido, o tratamento das AIS também representa um desafio. As lesões muitas vezes se encontram altas no canal

Endereço: Avenida Rui Barbosa, 716 - Flamengo (Prédio da Genética - Térreo, sala 1)
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2554-1991 **E-mail:** cep.iff@fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 6.326.792

endocervical e o AIS tem sido associado a lesões glandulares multifocais que se estendem para além da margem da ressecção, por isso a histerectomia é considerada como tratamento definitivo. No entanto, a maioria das pacientes tem, ao diagnóstico, uma idade média de 30 a 40 anos e grande parte não completou sua intenção procriativa. Impõe-se então uma abordagem mais conservadora em termos de tratamento neste grupo de pacientes. A conização tem sido adotada como alternativa à histerectomia mas é necessária uma estratégia eficaz que permita a detecção precoce de doença persistente, recorrente ou invasiva visto que o adenocarcinoma tem um prognóstico pior que o carcinoma de células escamosas, com diferenças de 10-20% nas taxas de sobrevida no período de 05 anos. No presente estudo pretende-se avaliar, dentre as pacientes que obtiveram diagnóstico de AIS e foram submetidas à tratamento conservador, quais os biomarcadores se mostraram presentes no material cirúrgico (peça do cone) que pudessem atuar como preditores de persistência, recidiva e progressão da doença. Serão estudados a presença de DNA-HPV de alto risco com genotipagem e os biomarcadores Ki-67, p16 e geminina nas peças cirúrgicas. Outras variáveis como idade, tabagismo, paridade, citologias de seguimento e volume da peça de cone também serão avaliadas. O seguimento pós tratamento conservador do AIS compreende consultas semestrais com reavaliação citológica e colposcópica, biópsia caso se observe lesão colposcópica e possíveis procedimentos cirúrgicos adicionais (reconização, traquelectomia ou histerectomia) caso se apresente doença. Trata-se de um estudo retrospectivo com análise dos prontuários do serviço de PTGI do Hospital das Clínicas do Paraná- UFPR, do serviço de PTGI do Instituto Fernandes Figueira- FIOCRUZ e do laboratório Jarbas Doles- Goiânia no período de 2010 a 2020. Todas as pacientes com diagnóstico histológico de adenocarcinoma in situ (AIS) serão estudadas no seguimento pós conização. Serão excluídas aquelas sem seguimento, considerado como período mínimo de 6 meses. Serão avaliados nos blocos de cone a presença ou ausência do DNA-HPV de alto risco e sua genotipagem e dos biomarcadores Ki 67, p16 e Geminina e a evolução destas pacientes para persistência, recidiva ou progressão de doença. Intenciona-se avaliar o

Endereço: Avenida Rui Barbosa, 716 - Flamengo (Prédio da Genética - Térreo, sala 1)
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2554-1991 **E-mail:** cep.iff@fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 6.326.792

perfil da paciente que evolui com clearance ou doença e os fatores associados a essa evolução."

Objetivo da Pesquisa:

As informações referentes aos "Objetivos do Projeto", foram obtidas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2159393 de 07/09/2023).

"Objetivo Primário:

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a presença do HPV de alto risco e sua genotipagem e os biomarcadores p16, Ki 67 e geminina nas peças de cone das pacientes submetidas a tratamento conservador após diagnóstico de AIS. A finalidade é avaliar a importância dos mesmos como preditores de doença recorrente, residual ou de progressão

Objetivo Secundário:

Avaliar a taxa de doença residual, recorrente e de progressão da doença relacionados à presença ou ausência dos biomarcadores

Avaliar, dentre os HPV de alto risco, os mais associados à evoluções desfavoráveis.

Avaliar a idade como preditor de progressão ou recorrência da doença.

Avaliar a correlação entre diagnósticos citológicos de encaminhamento e correspondente histológico.

Avaliar o comprometimento das margens do cone como preditor de doença residual, recorrente, ou de progressão de doença

Avaliar o volume do cone como preditor de recorrência, ou progressão da doença.

Avaliar tempo médio do seguimento onde se observou recorrência ou progressão da lesão,"

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As informações referentes à "Avaliação dos Riscos e Benefícios", foram obtidas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2159393 de 07/09/2023).

"Riscos:

A pesquisa será realizada com dados de arquivo- peças cirúrgicas e prontuários

Risco de dano e perda de material

Benefícios:

Proporcionar tratamento mais conservador com segurança."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante visando melhorar a compreensão dos mecanismos envolvidos na persistência,

Endereço: Avenida Rui Barbosa, 716 - Flamengo (Prédio da Genética - Térreo, sala 1)
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2554-1991 **E-mail:** cep.iff@fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 6.326.792

recidiva e progressão da doença endocervical do colo uterino, adenocarcinoma, utilizando biomarcadores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1-folha de rosto [ok]
- 2-carta de autorização da(s) chefia(s) de setor(es)/serviço(s) [ok]
- 3-carta do Departamento de Pesquisa -[ok]
- 4-projeto original/brochura do pesquisador - [ok]
- 5-TCLE/TALE - [ok]

Recomendações:

O relatório final da pesquisa deve ser encaminhado ao CEP por ocasião do término do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador atendeu a pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2159393.pdf	07/09/2023 18:47:54		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECEPiff.pdf	07/09/2023 18:46:05	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartarespostaCEPiff.pdf	07/09/2023 18:45:47	Rita Maira Zanine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Formulario_respostalFF.pdf	16/08/2023 08:55:27	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	CartaAutorizacaoChefia.pdf	17/07/2023 16:36:52	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	Carta_Registro.pdf	17/07/2023 16:32:24	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	carta_autorizacao_coloaboracao_assinado.pdf	17/07/2023 16:31:03	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	emenda1qualificacaoword.docx	19/05/2023 18:46:33	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	emenda1qualificacaopdf.pdf	19/05/2023 18:46:17	Rita Maira Zanine	Aceito

Endereço: Avenida Rui Barbosa, 716 - Flamengo (Prédio da Genética - Térreo, sala 1)
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2554-1991 **E-mail:** cep.iff@fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 6.326.792

Outros	emenda1concordanciaword.docx	19/05/2023 18:45:59	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	emenda1concordanciapdf.pdf	19/05/2023 18:45:30	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracao1participanteJD1word.docx	19/05/2023 18:44:47	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracao1participanteJD1pdf.pdf	19/05/2023 18:44:28	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracao1participanteIFFword.docx	19/05/2023 18:43:57	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracao1participanteIFFpdf.pdf	19/05/2023 18:43:26	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	Emenda1Projeto1PBword1.docx	19/05/2023 18:42:48	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	EmendaProjeto1PBpdf.pdf	19/05/2023 18:40:37	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	1cartaemendaword.docx	19/05/2023 18:39:58	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartaemenda1pdf.pdf	19/05/2023 18:39:34	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartaemenda.docx	19/05/2023 18:13:04	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartarespostapdf.pdf	19/05/2023 18:09:17	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartarespostaword.docx	19/05/2023 18:07:49	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracaoparticipanteJD1.docx	21/04/2023 19:12:27	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracaoparticipanteJD1.pdf	21/04/2023 19:10:25	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracaoparticipanteIFF.docx	21/04/2023 19:06:55	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	declaracaoparticipanteIFF.pdf	21/04/2023 19:05:29	Rita Maira Zanine	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	EmendaProjetoPBword1.docx	21/04/2023 19:03:52	Rita Maira Zanine	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	EmendaProjetoPBword.pdf	21/04/2023 19:00:40	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	emendaqualificacao.docx	21/04/2023 18:58:54	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	emendaqualificacao.pdf	21/04/2023 18:57:17	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartaemenda.pdf	21/04/2023 18:44:29	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartaemendaword.docx	04/04/2023	Rita Maira Zanine	Aceito

Endereço: Avenida Rui Barbosa, 716 - Flamengo (Prédio da Genética - Térreo, sala 1)
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2554-1991 **E-mail:** cep.iff@fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 6.326.792

Outros	cartaemendaword.docx	16:21:43	Rita Maira Zanine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensaconsentimento.pdf	13/05/2022 18:06:47	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	Ausenciacustos.pdf	13/05/2022 18:05:14	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	cartaconcordanciaorientador.pdf	13/05/2022 18:04:35	Rita Maira Zanine	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 27 de Setembro de 2023

Assinado por:

MARIA DE FATIMA JUNQUEIRA MARINHO
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Rui Barbosa, 716 - Flamengo (Prédio da Genética - Térreo, sala 1)
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2554-1991 **E-mail:** cep.iff@fiocruz.br

ANEXO 4- ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NA ANNALS OF DIAGNOSTIC PATHOLOGY

Annals of Diagnostic Pathology 62 (2023) 152054



Contents lists available at ScienceDirect

Annals of Diagnostic Pathology

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



Diagnostic value of p16 and Ki-67 expression in cervical glandular intraepithelial disease: A review

Patrícia Pereira Pinto^{*}, 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:

Cervical glandular intraepithelial disease
Immunohistochemistry
p16
Ki67

ABSTRACT

Objectives: Cervical adenocarcinoma has been increasing in frequency, particularly among young women. Its diagnosis still presents many challenges. In addition to the difficulty in accessing the lesion, the lack of well-established criterias for cytological and histological diagnosis, and colposcopic images that are often not very clear, there are many benign situations that mimic glandular diseases. Immunohistochemistry has been used to aid this diagnosis. The purpose of this review is to evaluate the data available in the literature related to the use of p16 and Ki-67 as an auxiliary tool in the diagnosis of glandular disease.

Methods: Original articles were searched in the PUBMED/MEDLINE, EMBASE, SCOPUS and BVS using different combinations of keywords and descriptors.

Results: Of the 83 initial articles, 10 were selected. The criterias used for immunohistochemical interpretation showed many differences. The studies compared benign pathologies to malignant pathologies and some used panels with different immunomarkers while others used only p16. P16 showed an intense staining pattern in malignant pathologies, despite some studies have shown a negative pattern in adenocarcinoma. This can be explained by the histological subtype, not always related to HPV. Some studies have shown immunopositivity for p16 in normal tissues, tubal metaplasia and cervical endometriosis, but the staining pattern was never intense, as in malignant tissues. Ki-67 showed a more intense staining in AIS and adenocarcinoma tissues and was also present in normal tissues, mainly in tubal metaplasia and cervical endometriosis.

Conclusions: Biomarkers have proved to be important tools in aiding the diagnosis of glandular lesions, either alone or in panels. Standardization in the interpretation of immunochemistry is required.

1. Introduction

1.1. Cell cycle and oncogenesis

The development of neoplasia is associated with abnormalities in cell cycle control and in the mechanisms of apoptosis. The cell cycle is the set of phases through which the cell passes from its origin to its duplication. This sequence of phases, with their respective checkpoints, allows the cell to complete its normal cycle, while maintaining the integrity of its genome [1]. Progression through the cell cycle is controlled by proteins called cyclin dependent kinases (CDKs) and their inhibition controlled by CDK inhibitors (CDKis). Cell division stimulating genes are proto-oncogenes and cycle-blocking genes are tumor suppressor genes. Mutations in these genes lead to the loss of normal cell cycle controlling mechanisms [1].

Genes that control life span or program cell death also directly intervene in tumor genesis [1]. All cells carry control programs of their lifetime, among these mechanisms, apoptosis provides a quickly elimination of unnecessary or dangerous cells [1]. Telomerase deserves to be highlighted as a gene that determines cell life and death. Its normal function protects the chromosome, allowing repair of eventual damages and stabilizing the genome [1].

Molecular markers enter this scenario as a diagnosis, prognostic and therapeutic perspective. By understanding the mechanism of action of the genes involved in tumor genesis, it is possible to intervene deactivating inappropriately activating oncogenesis, inducing defective cells to apoptosis, preventing proliferation and metastasis [1].

^{*} Corresponding author.

E-mail address: pitppp@gmail.com (P. Pereira Pinto).

<https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2022.152054>

Available online 14 October 2022

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

1.2. Significance of p16 and Ki 67 in cervical cancer

P16 is a regulatory protein of the cell cycle. Its main function is the inhibition of cyclin-dependent kinases (CDK4 and CDK6) that are needed to phosphorylate the retinoblastoma protein (pRb). It is a marker of the oncogenic activity of the HPV E7 protein, which has the ability to bind to pRb leading to rapid cell cycle progression with loss of control over DNA integrity. This binding to pRb releases p16 production from its negative feedback control, with its levels increasing in the cell, in an attempt to inhibit this uncontrolled proliferation. Therefore, abnormal p16 expression is a marker of pRb E7 mediated inactivation and can be used as an indicator of high risk HPV with transformation potential [3,14]. P16 indicates much more than the presence of a high-risk virus [12]. High-risk HPV can be present without anything happening, p16 is a sensitive and specific marker of potentially transforming lesions.

Through immunohistochemistry, p16 can be observed as cytoplasmic and/or nuclear staining. Mutations in this protein and/or its inactivation have been demonstrated in numerous cancers [7].

The importance of p16 in squamous intraepithelial lesions is well established. Based on LAST recommendations, p16 immunohistochemistry is a sensitive and specific method for diagnosing HPV DNA positive cervical squamous intraepithelial lesions [14] and it is well defined that p16 overexpression is associated with carcinoma.

HPV-induced cervical glandular lesions are almost invariably p16 positive [3], however, there is still no consensus on the use of the biomarker in these lesions [12]. Some benign conditions also present overexpression of p16, such as endocervical tubal metaplasia and endometrial glands.

Ki-67 is a nuclear protein. It is considered a marker of cell proliferation and is expressed in all phases of cell division [9]. The immunostaining of ki-67 in the squamous epithelium of the normal uterine cervix is restricted to the basal layers, as they are in constant renewal, in these layers there will always be cells in mitosis and marking for Ki-67. When this labeling is detected in other layers of the epithelium, it can be suggested that there is deregulation of the cell cycle.

Ki-67 was one of the first markers used in an attempt to better define glandular lesions. Studies show an increased expression in adenocarcinomas but it is not a specific marker of neoplastic diseases, it also has expression in non-neoplastic conditions [2].

1.3. Importance of the use of biomarkers in the diagnosis of cervical glandular lesions

The incidence of adenocarcinoma has been increasing every year, it affects young women and the diagnosis of glandular lesions has many limitations. Unlike squamous lesions, the cytological criterias for identifying glandular neoplasms are not well established and colposcopic changes are not very clear. In addition to technical difficulties, there is great inter-observer variability and many benign situations that mimic glandular diseases, like inflammatory processes, response to irradiation, microglandular hyperplasia and tubo endometrioid metaplasia. Therefore, there is a great need for more specific methods to improve the diagnosis of glandular lesions in screening programs, allowing potential intervention in precursor lesions before they become invasive, and also reducing the number of unnecessary surgeries in benign glandular pathologies that mimic diseases.

Immunohistochemistry is a valuable adjunct while performing cervical histopathology, it can aid to distinguish cervical glandular dysplasia and adenocarcinoma from reactive changes [6]. Biomarkers can be used in both biopsy specimens and cytology smears. Proteins that regulate the cell cycle generally exhibit aberrant patterns of expression in cervical squamous neoplasms, but there are few studies of these markers in adenocarcinomas [10].

This review aims to evaluate the scientific data related to the use of p16 and Ki-67 as auxiliary tools in the diagnosis of glandular diseases.

2. Material and methods

This is a narrative review. A bibliographic search was carried out in the Embase, Pubmed, Scopus and BVS databases. For the search in Embase, Scopus and Pubmed, the following descriptors, keywords and their combinations were used: "glandular epithelium lesions" AND "uterine cervix", "adenocarcinoma", "adenocarcinoma in situ", "uterine endocervix", "endocervical glandular dysplasia", "cervical glandular intraepithelial neoplasia", "tubo-endometrial metaplasia", "microglandular hyperplasia", "endometriosis", "p16", "ki-67", "diagnosis", "prognosis". Twenty-two results were found in Embase, 23 results were found in Pubmed and 24 in Scopus. For the BVS search, the following descriptors, keywords and their combinations were used: "adenocarcinoma", "adenocarcinoma in situ", "cervix uteri", ("biomarcadores tumorais" OR "biomarkers, tumor"); ("diagnosis" OR "diagnóstico"), ("prognosis" OR "prognóstico") and 35 documents were found. The study eligibility criterias were original articles that evaluated the immunohistochemical expression of p16 and Ki-67, together or separately, as a diagnostic tool for cervical glandular lesions; articles with full text available on the CAPES portal and articles written in English, Portuguese or Spanish. There was no restriction regarding the year of publication. Of the total of 104 articles identified in electronic databases, after the exclusion of the duplicated, 22 were retrieved for further analysis based on the title and summary. After careful analysis of these full text articles, 10 were selected. Others 4 were obtained by indirect means: bibliographic references and gray literature. This review received no public or private funding (Fig. 1).

3. Results

The criterias used for the interpretation of p16 and Ki-67 were varied. While some studies considered the percentage of stained cells, others used the integrated score of staining intensity and percentage of stained cells. The score values used also differed between studies. (Table 1).

The expression of the biomarkers was evaluated in histological pieces of adenocarcinoma, adenocarcinoma in situ, glandular dysplasia and normal tissues, including tubal metaplasia and endometrial tissue (Table 2).

Negri et al. [2], in 2011, evaluated 82 pieces of cervical glandular tissue, including 15 adenocarcinomas. Of these, 10 showed >50 % of cells stained for p16, 2 showed >25 % of stained cells and 2 between 6 and 25 % of stained cells. Only one showed negativity for p16, despite

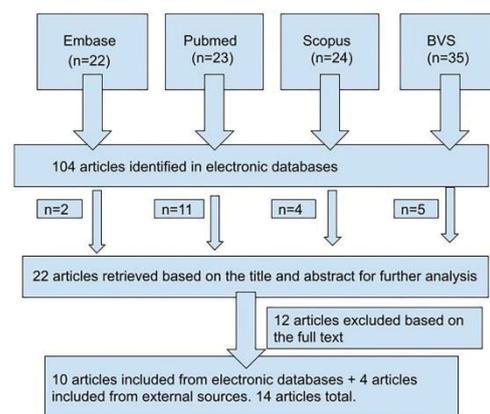


Fig. 1. Flowchart of the literature search process.

Table 1
 Criterias used for immunohistochemical interpretation according to authors.

Study	Criterias used for immunohistochemical interpretation
Negri [2]	% of stained cells (Score 0 to 3+)
2011	0 (0 to 5 %); 1+ (6 to 25 %); 2+ (26 to 50 %); 3+ (>50 %)
Schorge [10]	% of stained cells (Score 0 to 5+) + color intensity (0 to 3) = (Score 0 to 8)
2004	0 (0 %); 1+ (<5 %); 2+ (6 to 25 %); 3+ (26 to 50 %); 4+ (51 to 75 %); 5+ (>75 %)
	0 (no staining); 1+ (weak staining); 2+ (moderate staining); 3+ (strong staining)
Liang [8]	% of stained cells (Score 0 to 3+) + color intensity (0 to 3) = (Score 0 to 6)
2006	0 (<1 %); 1+ (2 to 10 %); 2+ (11 to 40 %); 3+ (>40 %); 0 (no staining); 1+ (weak staining); 2+ (moderate staining); 3+ (strong staining)
Murphy [7]	Qualitative analysis of staining
2004	Negative - focal - diffuse
Cameron [11]	Used different criterias for p16 and Ki-67
2002	p16: color intensity Negative (0); focal (<50 % staining); diffuse (>50 % staining) Ki-67: color intensity = Score 0 to 3 0 (0 %); 1+ (<10 % staining); 2+ (10 to 30 % staining); 3+ (>30 % staining)
Jr [4]	% of stained cells (Score 0 to 5+) + color intensity (0 to 3) = (Score 0 to 8)
2017	0 (0 %); 1+ (<5 %); 2+ (6 to 25 %); 3+ (26 to 50 %); 4+ (51 to 75 %); 5+ (>75 %)
	0 (no staining); 1+ (weak staining); 2+ (moderate staining); 3+ (strong staining)
Negri [5]	Qualitative analysis of staining
2003	Negative - focal - diffuse

having a positive test for HPV. There were no negative cases for Ki-67 and most concentrated in the highest scores (>25 % of stained cells). All AIS showed strong positivity for p16 and the vast majority strong positivity for Ki67. One case of glandular dysplasia was negative for p16 and all the others had >50 % of the cells stained. One case was negative for Ki-67 and the others showed >25 % of stained cells. Normal tissues were divided into samples of tubal metaplasia (5), microglandular hyperplasia (5), endometrial tissue (4) and tissues with non-specific inflammatory changes (8). Among them, the vast majority were negative for p16 (15/22), but positive scores (+1 and +2) were also observed. No strong positivity was observed among normal tissues. The same was observed with Ki-67. The vast majority was negative (16/22) and 6 of the 22 cases showed up to 50 % of stained cells.

Schorge et al. [10] evaluated adenocarcinoma (33), AIS (22) and normal tissue (5). The integrated score ranged from 0 to 8. In adenocarcinoma a high positivity score was observed for p16: $6,6 \pm 2,2$ and Ki-67: $4,9 \pm 1,5$. The same was observed in AIS with scores of $7,4 \pm 0,7$ for p16 and $5,0 \pm 2,1$ for Ki-67. In normal tissues, a score of $2,0 \pm 1,6$ for p16 and $1,4 \pm 0,6$ for Ki-67 was observed.

Liang et al. [8] evaluated AIS, glandular dysplasia and benign mimics. It used an integrated score of 0–6 points. All benign cases were negative or had low expression of p16 (score 0,3) and presented a score of 2,0 for Ki-67. All cases of AIS had high scores for p16 (5,2) and Ki-67 (5,5). Glandular dysplasia showed a score of 3,3 for p16 and 2,5 for Ki-67.

In Murphy et al. [7] study, all normal tissues were negatives for p16. Adenocarcinomas and AIS showed a diffuse staining pattern for p16 in all cases. In glandular neoplasms there was no negativity for p16 and the cases were divided between focal and diffuse patterns for p16. Regarding tubal metaplasia and endometrial cells, a diffuse pattern of p16 staining was not observed, but 10 out of 12 cases showed focal positivity for p16. Only 2 cases were negative for p16.

Cameron et al. [11] used different scores for the assessment of p16 and Ki-67. Regarding p16, all cases of cervical glandular intraepithelial neoplasia presented a diffuse staining pattern, while in microglandular hyperplasia all cases presented a negative score. In tubal metaplasia 08 out of 13 cases showed staining in <50 % of the cells, while the rest, 05

out of 13 cases, were negative. Endometriosis showed 01 negative case, 03 with focal staining and 03 with a diffuse pattern. Regarding Ki-67, there were no negative cases. 18 cases out of 21 showed a 2+ or 3+ pattern, only 03 cases showed <10 % of cell staining. In the cases of metaplasia, all had <10 % of cell staining. There were no cases of endometriosis cells with >30 % staining, there was 01 negative case, 04 cases score 1+ and 02 cases score 2+. Glandular hyperplasia was divided into: no positivity (8/14) and <10 % of cell staining (6/14).

Jr. et al. [4] compared the expression of p16 in histological samples of endocervical polyps and cervical adenocarcinoma. All polyp cases were negative for p16 expression while most adenocarcinoma cases were positive (66 %). The lack of expression in all cases of adenocarcinoma can be explained by the fact that not all histological types of adenocarcinoma are related to HPV [13]. In this study, p16 showed a sensitivity of 66 % and a specificity of 100 %. Although not absolute in the final diagnosis, it can be extremely useful in cases of diagnostic doubt.

In 2003, Negri et al. [5] evaluated 45 histological pieces of cervical glandular tissue: 18 adenocarcinomas, 8 adenocarcinoma in situ, 4 glandular intraepithelial neoplasia and 15 normal tissue. All adenocarcinomas were positive for p16, only one with focal pattern. All AIS showed positivity for p16. Endocervical glandular atypia showed focal positivity for p16. All benign tissues were negative for p16.

4. Discussion

The early detection of cervical lesion precursors represents the greatest challenge in screening programs [5] and in glandular diseases this difficulty is even greater both in the identification of the existing lesion as in the differential diagnosis with benign lesions that mimic neoplasia. This diagnostic difficulty is particularly dangerous in glandular lesions because they present a faster development to invasion and have a worse prognosis. Immunohistochemistry has proved to be of enormous value in this diagnostic aid.

The terminologies used in cervical glandular diseases have changed a lot over the years and until today we see different names for the same pathology. We can see European works (UK) using the classification of high grade intraepithelial neoplasia, which corresponds to AIS, and low grade intraepithelial neoplasia, corresponding to glandular dysplasia. The WHO uses the terms glandular dysplasia and adenocarcinoma in situ. Brazilian guidelines classify glandular lesions into atypical glandular cells of undetermined significance, possibly non-neoplastic, atypical glandular cells of undetermined significance when high grade intraepithelial lesion cannot be excluded, adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma.

The criterias utilized to interpret the expression of biomarkers varied between studies. In 2011 the study of Negri et al. [2] was based on the percentage of stained cells, while in his oldest study he used the criteria of qualitative analysis of staining (diffuse, focal or negative for p16). Schorge et al. [10] and Jr. et al. [4] used the same integrated score where the intensity of staining was evaluated together with the percentage of stained cells. Liang et al. [8] also used an integrated score where he combined the intensity and percentage of stained cells but with a different punctuation. Murphy et al. [7] considered all material that showed intense nuclear and/or cytoplasmic staining as positive. This lack of standardization makes it difficult to interpret the results as a whole.

In 2018 the British Association of Gynecological Pathologists standardized the interpretation of p16 expression in the squamous and glandular epithelium of the cervix. Normal endocervical epithelium is usually completely negative, with no staining for p16. In reactive epithelium, positive stained cells are occasionally observed, but they are weakly stained and dispersed irregularly in the epithelium. Tubo endometrial metaplasia and cervical endometrial epithelium usually show irregular staining of epithelial cells [3]. The abnormal glandular epithelium presents with strong, diffuse and continuous expression of

Table 2
Expression of biomarkers according to histological tissue.

Study	Biomarkers	Result of immunohistochemistry / Histology																																																					
Negri [2] 2011	p16 - Ki67 - proEX	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="4">p16</th> <th colspan="4">Ki67</th> </tr> <tr> <th>0</th> <th>1+</th> <th>2+</th> <th>3+</th> <th>0</th> <th>1+</th> <th>2+</th> <th>3+</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AC (15)</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>10</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>6</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>AIS (29)</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>29</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>3</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>GD (16)</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>15</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>8</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>NT (22)</td> <td>15</td> <td>5</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>16</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>		p16				Ki67				0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+	AC (15)	1	2	2	10	0	1	6	8	AIS (29)	0	0	0	29	0	1	3	25	GD (16)	1	0	0	15	1	0	8	7	NT (22)	15	5	2	0	16	3	3	0
	p16				Ki67																																																		
	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+																																															
AC (15)	1	2	2	10	0	1	6	8																																															
AIS (29)	0	0	0	29	0	1	3	25																																															
GD (16)	1	0	0	15	1	0	8	7																																															
NT (22)	15	5	2	0	16	3	3	0																																															
Schorge [10] 2004	p16 - p21 - p27 Cyclin D1, Cyclin E p53, Ki67	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>p16</th> <th>Ki67</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AC (33)</td> <td>6,6 ± 2,2</td> <td>4,9 ± 1,5</td> </tr> <tr> <td>AIS (22)</td> <td>7,4 ± 0,7</td> <td>5,0 ± 2,1</td> </tr> <tr> <td>NT (5)</td> <td>2,0 ± 1,6</td> <td>1,4 ± 0,6</td> </tr> </tbody> </table>		p16	Ki67	AC (33)	6,6 ± 2,2	4,9 ± 1,5	AIS (22)	7,4 ± 0,7	5,0 ± 2,1	NT (5)	2,0 ± 1,6	1,4 ± 0,6																																									
	p16	Ki67																																																					
AC (33)	6,6 ± 2,2	4,9 ± 1,5																																																					
AIS (22)	7,4 ± 0,7	5,0 ± 2,1																																																					
NT (5)	2,0 ± 1,6	1,4 ± 0,6																																																					
Liang [8] 2006	p16 - CEA Ki67 p53 ER /PR	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>p16</th> <th>Ki67</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AIS (14)</td> <td>5,2</td> <td>5,5</td> </tr> <tr> <td>GD (7)</td> <td>3,3</td> <td>2,5</td> </tr> <tr> <td>BM (14)</td> <td>0,3</td> <td>2,0</td> </tr> </tbody> </table>		p16	Ki67	AIS (14)	5,2	5,5	GD (7)	3,3	2,5	BM (14)	0,3	2,0																																									
	p16	Ki67																																																					
AIS (14)	5,2	5,5																																																					
GD (7)	3,3	2,5																																																					
BM (14)	0,3	2,0																																																					
Murphy [7] 2004	p16	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="3">p16</th> </tr> <tr> <th>negative</th> <th>focal</th> <th>diffuse</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TN (12)</td> <td>12</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>cGIN (6)</td> <td>0</td> <td>3</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>AIS (6)</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>		p16			negative	focal	diffuse	TN (12)	12	0	0	cGIN (6)	0	3	3	AIS (6)	0	0	6																																		
	p16																																																						
	negative	focal	diffuse																																																				
TN (12)	12	0	0																																																				
cGIN (6)	0	3	3																																																				
AIS (6)	0	0	6																																																				

AC (11)	0	0	11
TEM (12)	2	10	0

Cameron [11] 2002 Ki67, p16 bcl2

p16	p16			Ki67	Ki67			
	negative	focal	diffuse		0	1+	2+	3+
cGIN (21)	0	0	21	cGIN (21)	0	3	10	8
TEM (13)	5	8	0	TEM (13)	8	5	0	0
EN (7)	1	3	3	EN (7)	1	4	2	0
MH (14)	14	0	0	MH (14)	8	6	0	0

Jr [4] 2017 p16

	p16 negative	p16 positive
EP	100%	0%
AC	10 (33,4%)	20 (66,6%)

Negri [5] 2003 p16

p16	diffuse	focal	negative
AC (18)	17	1	0
AIS (8)	8	0	0
EGA (4)	0	4	0
NT (15)	0	0	15

Abbreviations: AC-adenocarcinoma; AIS-adenocarcinoma in situ; GD- glandular dysplasia; NT- normal tissue. BM- benign mimics; cGIN- cervical glandular intraepithelial neoplasia; TEM-Tubo-endometrial metaplasia; EP- Endocervical polyp; EN- cervical endometriosis; MH-Microglandular hyperplasia; AGE EGA-Endocervical glandular atypia.

staining, which can be nuclear or, more commonly, nuclear and cytoplasmic [3]. The terminology used is: presence X absence of abnormal diffuse positivity or abnormal diffuse positivity X normal/negative/unequal expression [3]. The expression “score” or “percentage of stained cells” is no longer used. The expression used is “strong and diffuse”.

We could observe that the pattern of positivity is more important than the simplistic classification into positive or negative for p16. The studies seen here showed patterns of p16 positivity for benign lesions, mainly endometrioid and tubal metaplasia lesions, but generally focal or low intensity patterns. This immunopositivity may be due to the similarity with their cells of origin: endometrial and fallopian cells, where both exhibited p16 expression. The criterion for malignant lesions is strong and diffuse expression.

Some studies point to this positivity in normal tissues as a limitation

in the practical use of p16 in glandular disease and recommend the use of a panel of immunomarkers.

Immunohistochemistry is a complementary method of diagnostic aid, it does not replace the morphological criteria for classifying lesions. The morphological criterion is the gold standard for classifying atypia.

5. Conclusions

The lack of a uniform terminology for cervical glandular pathologies and the lack of a uniform interpretation of the results in immunohistochemistry makes the evaluation of results more difficult. The standardization of the p16 immunohistochemical interpretation by the British Association of Gynecological Pathologists brought an important contribution in this respect.

The mechanisms involved in p16 and Ki-67 expression are different. P16 marks the oncogenic activity of HPV E7 while Ki-67 is a generic proliferation marker [2]. P16 shows a diffuse cytoplasmic and nuclear staining pattern in most neoplastic tissues. Its expression in normal tissues is negative, with exception of tubal metaplasia and endometrial tissue, which are the most important mimics of glandular neoplasia. But the expression patterns in these tissues are irregular, being in most cases easily distinguishable from the diffuse pattern in the neoplasm [2]. Ki-67 in non-neoplastic samples also shows a positive pattern distinct from that of neoplastic tissue.

P16 and Ki 67 proved to be important tools in the diagnosis of cervical glandular neoplasia, however, both have limitations [2]. Their combination may be useful in some cases, particularly in the rare cases of p16- negative glandular neoplasms [2]. In most cases, the isolated use of p16 improves the diagnostic accuracy of cervical glandular pathology.

After the presented analysis of the literature we can conclude:

- The standardization of the immunohistochemistry interpretation will help us gain more knowledge about this cervical disease.
- Immunohistochemistry results should be interpreted based on the pattern of positivity.
- p16 and ki67 are important tools in diagnosis but the morphological criterion of the lesions remains the gold standard.
- Immunomarkers should be used when there is diagnostic doubt.
- P16 is an important marker to identify potential transforming lesions.

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] Is WARD. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 2002;46(4):351–60. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302002000400006>.
- [2] Negri G, Bellisano G, Carico E, et al. Usefulness of p16, ProEX C and Ki 67 for the diagnosis of glandular dysplasia and adenocarcinoma of the cervix uteri. Int. J. Gynecol. Pathol. 2011;30:407–13. <https://doi.org/10.1097/pgp.0b013e31820a79b0>.
- [3] Singh N, Gilks CB, Wong RW.C, et al. Interpretation of the p16 Immunohistochemistry in Lower Anogenital Tract Neoplasia. The British Association of Gynecological Pathologists 2018. <https://www.bgps.org.uk>. [Accessed 12 June 2022].
- [4] Jr JE, Lima TS, Cunha MPS, et al. Immunohistochemical expression of the tumor suppressor protein p16INK4a in cervical adenocarcinoma. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2017;39:21–5. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1598042>.
- [5] Negri G, Egarter-Vigl E, Kasel A, et al. P16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. Am. J. Surg. Pathol. 2003;27(2):187–93. <https://doi.org/10.1097/00000478-200302000-00006>.
- [6] Panicker R, Mustafa S. Immunohistochemistry: a valuable tool in the management of common female genital tract tumors- a clinicians perspective. Journal of South Asian Federation of Obstetrics and Gynecology 2021;13(2):131–4. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10006-1880>.
- [7] Murphy N, CCBB Hefron, King B, et al. p16INK4A positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. Virchows Arch. 2004;445:610–5. <https://doi.org/10.1007/s00428-004-1111-4>.
- [8] Liang J, Mittal KR, Wei JJ, et al. Utility of p16INK4a, CEA, Ki67, P53 e ER/PR in differential diagnosis of benign, premalignant and malignant glandular lesions of the uterine cervix and their relationship with silverberg scoring system for endocervical glandular lesions. Int. J. Gynecol. Pathol. 2006;26:71–5. <https://doi.org/10.1097/01.pgp.0000225851.97739.9f>.
- [9] Silva VR. O impacto da marcação imuno-histoquímica para p16 e Ki 67 na reprodutibilidade diagnóstica das biópsias do colo uterino. Dissertation presented to the Postgraduate Program in Applied Research to the Health of Children and Women for the title of Master of Science 2017:1-88. <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25222>; 2017; 2017.
- [10] Schorge JO, Lea JS, Elias KJ. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. Am. J. Obstet. Gynecol. 2004;190:668–73. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.09.038>.
- [11] Cameron RI, Maxwell P, Jenkins D, et al. Immunohistochemical staining with MIB1, bcl2 and p16 assists in the distinction of cervical glandular intraepithelial neoplasia from tubo endometrial metaplasia, endometriosis and microglandular hyperplasia. Histopathology 2002;41:313–21.
- [12] Ishikawa M, Nakayama K, NAKAMURA K, et al. P16 expression might be associated with a favorable prognosis for cervical adenocarcinoma via dysregulation of the RB pathway. Sci. Report. 2021;11:18236. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01465.x>.
- [13] Stolnicu S, CHIU LHD, et al. Clinical outcomes of HPV associated and unassociated endocervical adenocarcinomas classified by the international endocervical adenocarcinoma criteria and classification (IECC). Am. J. Surg. Pathol. 2019;43(4):466–74. <https://doi.org/10.1097/pas.0000000000001224>.
- [14] Lee S, Sahasrabudhe VV, Mendoza-Cervantes D, et al. Tissue-based immunohistochemical biomarker expression in malignant glandular lesions of the uterine cervix: A Systematic Review. Int. J. Gynecol. Pathol. 2017;37:128–40. <https://doi.org/10.1097/pgp.0000000000000406>.