

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

Expressão de P16 e Ki-67 em lesão intraepitelial de alto grau em mulheres com até 30 anos

Giovana Fontes Rosin

Porto Alegre, 2022

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

Expressão de P16 e Ki-67 em lesão intraepitelial de alto grau em mulheres com até 30 anos

Giovana Fontes Rosin

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Arenhart Pessini

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2022

Aos meus pais, Cistina e Artemino, aos meus irmãos, Gustavo e Germano, e à minha sobrinha, Mikaela, pelo amor e apoio incondicional

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido amigo, Prof. Dr. Valentino Antônio Magno, pelo carinho, dedicação, apoio e confiança acadêmica e profissional durante essa minha trajetória.

À minha orientadora, Profa. Dra. Suzana Arenhart Pessini, pela acolhida em virtude da transição de orientador. Muito obrigada, por contribuir para o meu crescimento. Meu respeito e admiração ao profissionalismo ético e moral.

À professora Raquel Camara Riveiro, pelos ensinamentos e colaboração na elaboração desta dissertação.

Ao senhor, Prof. Dr. Edison Capp, pelo aprendizado que foi além do acadêmico no curso de pós-graduação.

Ao professor Dr. Charles Francisco Ferreira, pela constante disponibilidade para a realização deste estudo e incentivo, para o seguimento acadêmico da pesquisa.

Aos colegas e funcionárias da zona pelo convívio semanal.

Meu muito obrigada a todos, por eu ter chegado até aqui, levando em consideração as adversidades trazidas pela pandemia desde 2020. Sem vocês, nada disto seria possível.

*“Pássaros criados em gaiolas acreditam
que voar é uma doença”.*

Alejandro Jorodows

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DA LITERATURA	15
1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	15
2 Mapa Conceitual	17
3 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC).....	18
3.1 Etiologia e fatores de risco	18
3.2 Rastreamento e diagnóstico	20
3.3 Tratamento das lesões precursoras	24
4 Imuno-histoquímica.....	26
4.1 Biomarcadores.....	27
4.2 Protocolos utilizados para a realização das imuno-histoquímicas.....	30
JUSTIFICATIVA.....	34
HIPÓTESES.....	35
OBJETIVOS.....	36
Principal.....	36
Secundários	36
REFERÊNCIAS.....	37
ARTIGO	45
PERSPECTIVAS.....	65
ANEXO I – Instrumento de coleta de dados.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ACOG – *American College of Obstetrician and Gynecologists*

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ASCCP – *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*

CAP – *College of American Pathologists*

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* ou Vírus da Imunodeficiência Humana

HCV – *Hepatitis C Virus*

HPV – *Human Papillomavirus* ou Papiloma Vírus Humano

HSIL – *High Squamous Intraepithelial Lesion*

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IECC – *International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IHQ – Imunohistoquímica

IST – Infecções sexualmente transmissíveis

LAST – *The Lowe Anogenital Squamous Terminology*

LIEAG – Lesão Intaepitelial de Alto Grau

LIEBG – Lesão Intaepitelial de Baixo Grau

NHSCSP – *National Health Service Cervical Screening Programme*

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

OPAS – *Organização Panamericana de Saúde*

OMS – *Organização Mundial de Saúde*

PTGI – Patologia do Trato Genital Inferior

p16^{INK4a} – p16 (o p16 – marcador a p16 – proteína)

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Resultado da busca de referências nas seguintes bases de dados. 15

Figura 1 - Classificação das displasias cervicais.....32

Figura 2 - Expressão imuno-histoquímica da proteína ki-67, detectada por anticorpos primários, resultado de uma coloração vermelha.32

Figura 3- Expressão imuno-histoquímica da proteína p16, detectada por anticorpos primários, resultado de uma coloração marrom.33

RESUMO

Introdução: A imuno-histoquímica é uma técnica que avalia a associação de biomarcadores a alterações morfológicas, oferecendo maior reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade no diagnóstico de diversas neoplasias, estando o p16 associado ao HPV de alto risco e o Ki-67, à multiplicação celular. **Objetivo:** Determinar a expressão de p16 e Ki67 nas lesões intraepiteliais de alto grau em pacientes com idade igual ou inferior a 30 anos e correlacionar com variáveis clínicas e recidiva ou progressão. **Métodos:** Estudo transversal retrospectivo, em mulheres com diagnóstico anatomopatológico de (LIEAG) lesão intraepitelial de alto grau - NIC II/III, atendidas no ambulatório de ginecologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre abril de 2004 a abril de 2016. **Resultados:** Foram avaliadas 68 pacientes. A idade mediana (md) foi 27 anos e 47 (69,1%), não tabagistas. Apenas 21 (30,9%) delas possuíam o 2.º Grau completo e 5 (7,4%), Ensino Superior. Considerando as características anatomopatológicas, entre as pacientes, 53 (77,9%) delas apresentavam neoplasia intraepitelial cervical (NIC) III, e 15 (22,1%), neoplasia intraepitelial cervical (NIC) II. Praticamente todas apresentaram p16^{INK4a} e Ki67 positivos (97,1% e 98,5%, respectivamente) e 65 (95,6%) receberam alta ambulatorial, sendo que apenas 1 (1,5%) apresentou recidiva de lesão durante o seguimento. P16^{INK4a} e Ki67 se relacionaram positivamente (Spearman, $\rho=0.702$, $p\leq 0.001$). As análises não evidenciaram correlação do p16 e do Ki67 com as variáveis de interesse (idade, paridade, tabagismo e imunossupressão) nem com desfecho clínico (recidiva ou progressão). **Conclusão:** Os biomarcadores p16 e Ki67 não auxiliaram no

diagnóstico e no prognóstico de lesões precursoras em mulheres com idade até 30 anos.

Palavras-chave: Lesão intraepitelial cervical de alto grau; Câncer cervical; HPV; Biomarcadores; p16, Ki-67.

ABSTRACT

Background: Immunohistochemistry is a technique that evaluates the association of biomarkers with morphological changes, offering higher level of reproducibility, sensitivity and specificity in the diagnosis of various neoplasms, with p16, associated with high-risk HPV and Ki-67 with cell multiplication. **Objective:** To determine the expression of p16 and Ki67 in high grade intraepithelial lesions in patients aged 30 years or younger and correlate with clinical variables and relapse or progression. **Methods:** Retrospective cross-sectional study, in women diagnosed with histological of HSIL (high grade squamous intraepithelial lesion) – CIN 2/3 treated at the gynecology outpatient clinic of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, from April 2004 to April 2016. **Results:** Were evaluated 68 patients. The median (md) age was 27 years and 47 (69.1%), non-smokers. Only 21 (30.9%) of them had finished High School and 5 (7.4%) had Higher Education. Considering the histological characteristics, among the patients, 53 (77.9%) had cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 3, and 15 (22.1%), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2. Almost all were positive for p16INK4a and Ki67 (97.1% and 98.5%, respectively) and 65 (95.6%) were discharged from the outpatient clinic, and only 1 (1.5%) had a recurrence of the lesion during follow-up. P16INK4a and Ki67 were positively related (Spearman, $\rho=0.702$, $p\leq 0.001$). The analyzes showed neither correlation between p16 and Ki67 with the variables of interest (age, parity, smoking and immunosuppression) nor with clinical outcome (recurrence or progression). **Conclusion:** P16 and Ki67 biomarkers did not help in the diagnosis and prognosis of precursor lesions in women aged up to 30 years.

Keywords: High-grade cervical intraepithelial lesion; Cervical cancer; HPV; Biomarkers; p16, Ki-67.

INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero deve ser alvo de Políticas de Saúde Pública bem estruturadas, devido à alta prevalência em países pouco desenvolvidos. Esse câncer está associado a condições de vida precária, baixos índices de desenvolvimento humano, ausência ou fragilidade das estratégias de educação comunitária (promoção e prevenção em saúde) e à dificuldade de acesso a serviços públicos de saúde para diagnóstico precoce e tratamento das lesões precursoras [1].

Nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde (OMS), com o objetivo de reduzir a alta taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento, lançou a campanha para eliminar o câncer do colo do útero e apresentou os desafios até 2030: vacinação de 90% das meninas até 15 anos; rastreamento em 70% das mulheres entre 35-45 anos; tratamento de 90% das mulheres diagnosticadas com lesão pré-invasora ou invasora [2].

É a quarta neoplasia maligna mais frequente entre as mulheres em todo o mundo [3]. A taxa de incidência global é de 15,6/100.000 mulheres, variando de 7,2 na Austrália a 51/100.00 em Moçambique [4]. No Brasil, em 2020, a estimativa de novos casos foi de 16710 e 6.596 mortes em 2019 [5].

O Papilomavírus Humano (HPV) é um DNA vírus da família *papilomavírus*, e, até o momento, foram identificados 216 subtipos, caracterizados como baixo, médio e alto risco. Em torno de 40 infectam o trato genital, causando alterações no epitélio cervical que vão desde condilomas até carcinoma invasor. A infecção persistente pelo HPV subtipos de alto risco, principalmente os HPV 16 e 18, é o principal fator

oncogênico do câncer cervical, estando presente em aproximadamente 70% dos casos de tumor invasor [6, 7].

As lesões precursoras são geralmente assintomáticas e detectadas pelo rastreamento da citologia com técnica de Papanicolaou. Entretanto, a eficiência do teste é afetada pela elevada variabilidade interobservador e pelos altos índices de resultados falso negativo e falso positivo [8].

Estudos recomendam o uso de imunomarcadores, como ferramenta auxiliar no exame histopatológico de hematoxilina-eosina. A p16^{INK4a} (p16) é uma proteína supressora tumoral, amplamente estudada no ciclo de infecção pelo HPV. Diversos estudos mostram que a sua superexpressão está presente em quase 100% das lesões de alto grau e carcinomas, em 60% das lesões de baixo grau e, por outro lado, não é detectada em células cervicais normais [9].

REVISÃO DA LITERATURA

1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Foram realizadas buscas baseadas nas lesões cervicais e em sua associação com a infecção pelo HPV, utilizando associações das palavras HPV, HSIL, cervical cancer, cervical screening, p16 e Ki-67 nas bases de dados, Pubmed, Scielo e Lilacs, nos últimos cinco anos (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultado da busca de referências nas seguintes bases de dados.

Palavras-chaves	Pubmed	Scielo	Lilacs
HPV	14891	313	439
Cervical HSIL	1296	11	35
Cervical câncer	25580	593	758
Cervical câncer screening	11671	169	248
p16 and HPV	1261	7	30
Ki-67 and HPV	190	1	1

Fonte: dados de pesquisa.

Após foi realizado o cruzamento das palavras e utilizado os seguintes termos em cada base de dado abaixo apresentadas.

- Pubmed

Lesões cervicais, HSIL:

(Uterine Cervical Neoplasms[mh] OR Uterine Cervical Neoplasm*[tw] OR Cervix Neoplasm*[tw] OR Cancer of the Uterine Cervix[tw] OR Cancer of the Cervix[tw] OR Uterine Cervical Cancer[tw] OR Cancer of Cervix[tw] OR Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix[mh] OR Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix[tw] OR HSIL [tw])

AND

HPV:

(Papillomaviridae[mh] OR Papillomaviridae[tw] OR Human Papilloma Virus*[tw] OR Human Papillomavirus[tw] OR HPV [tw])

AND

(P16 protein, human[Supplementary Concept] OR Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p16[mh] OR Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p16[tw] OR p16INK4 Protein[tw] OR P16[tw])

AND

Ki-67:

Ki-67 Antigen[mh] OR Ki-67[tw] OR Ki 67[tw]) = 278

- Scielo

("uterine cervical neoplasm" OR "cervical cancer") AND ("HSIL" OR "Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix") AND ("Papillomavirus" OR "HPV") AND ("p16^{INK4a}" OR "p16") = 48

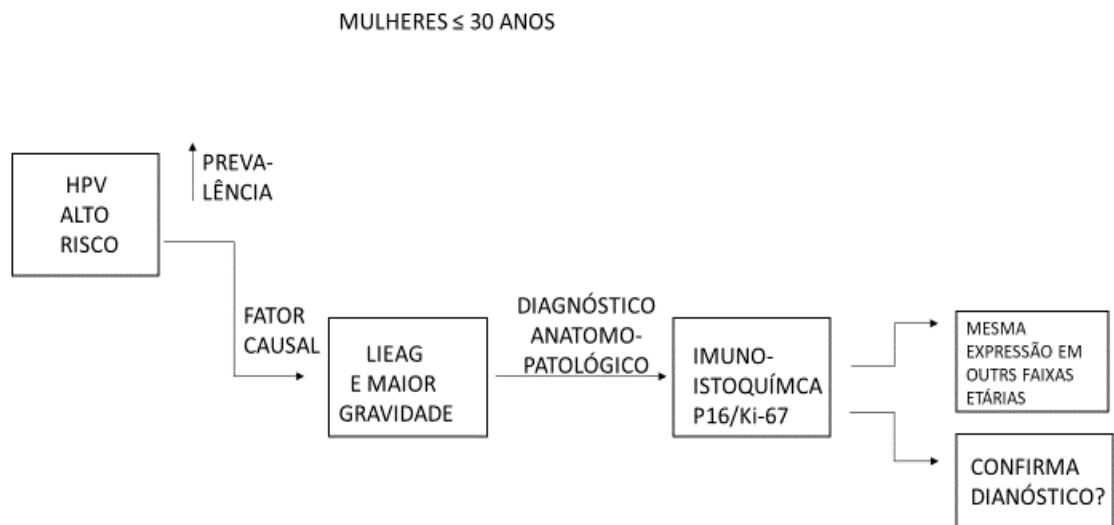
- Lilacs

("uterine cervical neoplasm" OR "cervical cancer") AND ("HSIL" OR "Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix") AND ("Papillomavirus" OR "HPV") AND ("p16^{INK4a}" OR "p16") = 43 – selecionados 80 artigos conforme relevância.

Foram incluídas também as *webpages* Pathologyoutlines.com.

2 Mapa Conceitual

Abaixo está descrito o mapa conceitual.



As lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG) são as verdadeiras lesões precursoras do câncer de colo uterino [6]. Tem como fator necessário a infecção persistente de um HPV oncogênico, com maior frequência os subtipos 16 e 18, associado aos fatores de risco, como tabagismo, imunossupressão, início precoce das relações sexuais, multiplicidade de parceiros, multiparidade, outras infecções sexualmente transmissíveis (IST) e baixo nível socioeconômico [7]. Embora seja um câncer de evolução lenta e que passa por períodos de lesões precursoras, o índice de mortalidade segue alto nos países em desenvolvimento [1, 4, 10].

O “LAST Project” Projeto de Padronização de Terminologia Escamosa Anogenital Inferior para Lesões associadas ao HPV, copatrocinado pelo *College of*

American Pathologists (CAP) e pela *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP)* (2012), passou a recomendar o uso apropriado dos biomarcadores por sua alta especificidade e sensibilidade, com o objetivo de aumentar a precisão diagnóstica dessas lesões e facilitar a comunicação entre patologistas e outras especialidades médicas [9, 11].

3 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC)

A neoplasia intraepitelial cervical (NIC) é uma lesão do epitélio escamoso da cérvix uterina, induzida pela infecção do HPV, cuja maturação anormal não vai além da camada basal do epitélio. Sua classificação citológica é dividida em lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG) ou NIC 1 e lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG) ou NIC 2/3 [12, 13].

A LIEBG (NIC 1), associada ao HPV de baixo risco, sobretudo os HPV 6/11, dificilmente progride para um câncer invasor; por outro lado, as LIEAG (NIC 2/3), causadas pelos subtipos oncogênicos, na grande maioria HPV 16/18, são consideradas as verdadeiras lesões precursoras do câncer cervical.

Destaca-se que as lesões glandulares não possuem a subclassificação anterior, estando o adenocarcinoma *in situ* (AIS) associado a NIC em 50% dos casos [14, 15, 16].

3.1 Etiologia e fatores de risco

A infecção persistente pelo HPV de alto risco é a principal causa de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e carcinoma invasor de colo do útero [7, 10].

O HPV pertence à família *papillomaviridae*, vírus com uma cadeia de DNA de dupla hélice, que possui em torno de 8.000 bases nitrogenadas, que codificam todas as funções do vírus, e seu genoma está dividido em 3 regiões: *Early* “E” ou região precoce (E1-E7), *Long Control Region* “LCR” ou região reguladora ou “URR” *Upstream Regulatory Region* e *Late* “L” ou região distal (L1-L2) [17, 18].

Quanto à região Early, esta é assim denominada por apresentar precocemente as suas proteínas no ciclo viral, tem a E6 e E7 como as mais relevantes, por seu grau de expressão estar diretamente relacionado ao grau de lesão cervical [19].

Entre os inúmeros subtipos, os de alto risco são reconhecidos como o principal fator oncogênico no câncer de colo uterino e das suas lesões pré-neoplásicas. Os mais frequentes são o HPV 16 e 18, presentes em torno de 70% dos casos de câncer cervical, seguidos de outros 9 subtipos, que são os HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 53, 56, 58, 59 [20].

Já os subtipos 6 e 11 produzem verrugas e lesões com baixo risco de progressão. Em lesões de baixo grau, o DNA do HPV se encontra de forma episossomal, e, nas lesões de alto grau, o DNA HPV se integra ao DNA da célula [21].

O processo oncogênico do HPV é determinado pela expressão desregulada das proteínas virais E6 e E7 durante a divisão celular. Ele infecta as células epiteliais da cérvix, formando partículas virais que se espalham pela camada basal, iniciando-se, desta forma, o processo de neoplasia intraepitelial. As células pré-neoplásicas resultam da integração do DNA do HPV no genoma celular do hospedeiro com a

superexpressão contínua das oncoproteínas . A E6 se liga à proteína p53, levando a sua degradação, e a E7 se liga e inativa a proteína do Retinoblastoma (pRb), interferindo na regulação do ciclo celular, causando uma proliferação descontrolada e favorecendo o avanço das lesões intraepiteliais cervicais [18, 22, 23].

É a infecção de transmissão sexual mais frequente no mundo. Estima-se que cerca de 80% das mulheres irão se contaminar com o HPV, principalmente nos 5 primeiros anos, após o início da vida sexual. Com o passar dos anos e o maior conhecimento sobre a evolução do vírus, os protocolos de rastreamento, seguimento e tratamento das lesões precursoras passaram a ser mais conservadores. Apesar dos altos índices de prevalência da infecção pelo HPV, a maioria é transitória e autolimitada, com taxas de eliminação espontânea em torno de 80% em 6 a 24 meses. A partir dos 30 anos de idade, é mais frequente a progressão da lesão [5, 15, 24].

3.2 Rastreamento e diagnóstico

A estratégia de rastreamento populacional do câncer de colo uterino tem como objetivo identificar precocemente as lesões precursoras (NIC 2/3), visando diminuir a taxa de incidência de lesão cervical invasora e impactando positivamente a diminuição da mortalidade [15, 16].

De acordo com o Ministério de Saúde e o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o rastreamento deve ser realizado dos 25 anos aos 64 anos na população sexualmente ativa. Os dois primeiros exames devem ser realizados com intervalo anual e, se ambos os resultados forem negativos, os próximos exames devem ser

realizados a cada três anos. Esta indicação está baseada na baixa incidência de câncer cervical e na alta prevalência de infecção transitória pelo HPV em pacientes jovens. O rastreamento antes dos 25 anos não causa um impacto importante na incidência ou mortalidade por câncer de colo do útero [1]. Já a Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) orienta que o rastreamento seja iniciado aos 21 ou aos 25 anos [15].

A *American Cancer Society* (ACS), assim como algumas sociedades europeias, também recomenda que o rastreamento comece aos 25 anos e termine aos 65. O intervalo das avaliações está na dependência dos métodos disponíveis: citologia, teste de DNA-HPV ou coteste (citologia e teste de DNA-HPV) e devem ser realizados a cada 3 ou 5 anos [25, 26, 27].

A OMS/OPAS preconizam três tipos de triagem na atualidade, de acordo com os recursos disponíveis de cada País [28]:

- Citologia convencional (CC) e citologia em base-líquida (CBL);
- Inspeção visual com ácido acético;
- Teste de HPV para subtipos específicos de alto risco.

1. Citologia: o citopatológico de colo uterino ou Pap test ou exame de Papanicolaou tem por finalidade rastrear e identificar pacientes portadoras de lesões precursoras ou invasivas no colo uterino, tendo em vista que este câncer se inicia com uma lesão pré-invasiva, curável em quase 100% dos casos [29]. É realizada de duas maneiras: convencional ou em meio líquido, ambas com sensibilidades semelhantes. A citologia líquida tem custo maior e permite a pesquisa de HPV, *Chlamydia* e *Neisseria* no mesmo material [30].

A citologia convencional, colhida da ectocérvice e da endocérvice, com espátula de Ayre e *cytobrush*, é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde no Brasil [1].

2. Colposcopia: é um exame realizado com um microscópio que visualiza a vagina e o colo do útero, com uma lente de aumento, chamada “colposcopio”. Possibilita ver a extensão e a gravidade da lesão e dirige a biópsia na área de maior gravidade [31, 32].

A citologia do colo uterino e a colposcopia foram introduzidas no Brasil a partir de 1940, e hoje são realizados aproximadamente 12 milhões de exames citopatológicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) [1, 5].

3. Teste de Biologia Molecular: é utilizado como ferramenta diagnóstica no rastreamento, diferenciando lesões benignas de lesões com potencial pré-neoplásicas e, no seguimento, após tratamento de uma lesão precursora [33].

4. Biópsia: o laudo histopatológico dá o diagnóstico confirmatório.

Os testes de biologia molecular utilizam principalmente as seguintes metodologias [34, 35]:

Captura Híbrida (CH) consegue diferenciar os grupos de HPV de alto risco dos HPV de baixo risco, porém não identifica o subtipo específico.

Hibridização *in situ* (HIS) não é considerada um teste diagnóstico pela necessidade de outra técnica adicional para detectar o tipo viral.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma reação enzimática que resulta na multiplicação de cópias de segmentos de genomas virais em amostras de DNA

e na amplificação da região L1 do HPV. É a única técnica utilizada de forma confiável em cortes de tecido fixados com formalina.

O Teste Cobas (4800 HPT Test), aprovado pela *Food Drug Administration* (FDA), é um PCR em tempo real que detecta individualmente o HPV16 e 18 e outros 12 genótipos de HPV de alto risco agrupados.

O rastreamento, baseado em teste de HPV, tem maior sensibilidade e reprodutibilidade com menor variabilidade, quando é comparado com a citologia convencional ou em base líquida, o que acarreta um número maior de colposcopias. Consequentemente, um maior número de neoplasia intraepitelial cervical (NIC 3) e de câncer cervical é diagnosticado [36].

A detecção do DNA-HPV de alto risco é capaz de identificar 90% das LIEAG ou câncer cervical. São mais de 40 subtipos carcinogênicos HPV que produzem infecções persistentes com risco de progressão das LIEAG. Não está indicada a genotipagem em pacientes jovens, abaixo de 30 anos, porque essa faixa etária, na sua grande maioria, apresenta infecção autolimitada, com eliminação espontânea da lesão e, em grande parte, o *clearance* do vírus [37, 38].

Desta forma, a maneira mais eficaz e confiável de reduzir a mortalidade por essa neoplasia maligna é encorajar as mulheres a participarem de um programa de rastreamento organizado. Nos EUA, cerca de metade das mulheres diagnosticadas com câncer cervical nunca foram submetidas ao Papanicolaou ou, pelo menos, não realizaram o exame nos últimos 5 anos. Assinala-se que os cânceres em pacientes adolescentes e no início da segunda década de vida são de progressão rápida, fogem da história natural da doença e, na sua grande maioria, não serão diagnosticados por

técnicas de rastreamento viáveis [39, 40]. Nesse contexto, é preciso lembrar que o diagnóstico se baseia na tríade: citologia + colposcopia + biópsia (histologia).

3.3 Tratamento das lesões precursoras

O tratamento das lesões precursoras vai depender do grau de displasia e dos fatores de risco associados.

No caso das LIEBG, a conduta, no geral, é conservadora, pois existe a eliminação espontânea da lesão em torno de 70-80% após um seguimento de 2 anos [41]. As LIEAG regridem espontaneamente em torno de 15-20%. Estudos mostram que somente as lesões das mulheres com HPV de alto risco irão progredir para uma lesão mais grave – cerca de 10% em 30 meses. Sendo assim, o tratamento oportuno e adequado da LIEAG diminui a chance de progressão para a doença invasora, impactando, de maneira positiva, a incidência e a mortalidade do câncer de colo [25, 36, 41].

1. Tratamentos ablativos: (crioterapia, termo ablação e laser de dióxido de carbono) são métodos ambulatoriais, de baixo custo, que não necessitam de anestesia e apresentam taxas de sucesso superiores a 90% em pacientes adequadamente selecionadas. Como limitação, não fornecem peça cirúrgica para avaliação histopatológica da lesão e de suas margens [42, 43].

2. Métodos excisionais: fornecem tecido para avaliação anátomo patológica e são métodos seguros e efetivos, os quais são detalhados a seguir [44].

Conização com lâmina fria: é a biópsia alargada do colo uterino, com a retirada de tecido em um formato de cone, abrangendo a ectocérvice e incluindo toda zona de transformação e o canal endocervical. Atualmente, é indicado quando há suspeita citohistopatológica de lesão invasora ou adenocarcinoma *in situ* ou microinvasão diagnosticada em biópsia.

LLETZ (*Large Loop Excision of the Transformation Zone*), LEEP (*Loop electrosurgical excision procedure*) ou CAF (*cirurgia de alta frequência*): trata-se da excisão ampla da zona de transformação, realizada por um equipamento eletrocirúrgico que contém uma alça, a qual combina corte com hemostasia, o que permite ressecar a maior parte da lesão de uma vez só, sem prejudicar a avaliação histopatológica. Diversos estudos mostram a mesma efetividade, quando comparada à conização a frio, entretanto gera menos efeitos adversos gestacionais, como parto prematuro e estenose de canal cervical [45, 46].

Em 2013, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a recomendar o método “ver e tratar” (do inglês *see and treat*). Em países de poucos recursos, com altas taxas de incidência e falta de profissionais de saúde e infraestrutura, é utilizada a inspeção do colo com ácido acético (VIA) e, se alterada, é preciso que seja feito o tratamento imediato com ablação (crioterapia ou termo ablação) ou CAF. Tal conduta é preconizada na primeira consulta, o que reduz o tempo entre a captação e o tratamento, evitando-se, assim, uma eventual perda de seguimento da paciente. O teste do HPV é o método mais indicado para rastreamento nesses países. Quando comparados os dois métodos, percebe-se que o teste de HPV fornece maior acurácia

diagnóstica das lesões precursoras e impacta positivamente a redução da mortalidade [1, 5, 47, 48].

Em agosto de 2020, a Assembleia Mundial de Saúde aprovou uma resolução que adotasse uma estratégia global, a fim de acelerar a eliminação do câncer de colo uterino, acabando com o sofrimento desnecessário de um câncer que pode ser prevenido e tratado. [8, 49, 50].

4 Imuno-histoquímica

Imuno-citoquímica: é a técnica de identificação de epítomos que analisam o material citopatológico (esfregaço sanguíneo, aspirado ou *swabs*).

Imuno-histoquímica: é a técnica com o mesmo objetivo da imuno-citoquímica, porém, com análise anatomopatológica (corte de tecido parafinado ou congelado) [51, 52].

O primeiro marco histórico importante nessa área foi a conjugação de um anticorpo em soro de coelho *antipneumococcus* para detectar antígenos, no qual fora utilizado um corante fluorescente. Essa técnica foi realizada por um médico patologista e imunologista, professor Albert Hewett Cools e colaboradores, do departamento de Bacteriologia e Imunologia de Harvard em 1941, e o artigo publicado fora em 1942 [53]. Albert Hewett Cools revolucionou a imunologia e biologia celular com técnicas de imunofluorescência, para detectar antígenos, anticorpos e proteínas antigênicas nas células e tecidos. O referido método é considerado um divisor de águas na Anatomia Patológica, por possibilitar a combinação de um marcador a um

anticorpo, sem lesar a ligação estabelecida e possibilitar a visualização microscópica dos locais onde se encontram o epítopo e o parótopo. Entretanto, com o passar dos anos, investigadores e patologistas vêm desenvolvendo técnicas cada vez mais detalhadas, para “aumentar a marcação”, ou seja, a coloração que está associada ao antígeno [54, 55].

A imuno-histoquímica é uma técnica integral, mundialmente difundida, que avalia a associação de biomarcadores com as alterações morfológicas, oferecendo, portanto, maior reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade no diagnóstico de diversas doenças infecto-parasitárias, degenerativas, neoplásicas, entre outras [55].

Na última década, houve um avanço no desenvolvimento de biomarcadores tumorais. Eles fornecem ferramentas de biologia molecular que auxiliam no diagnóstico precoce, prognóstico, eficácia de tratamento e risco de recorrência nas neoplasias. É cada vez mais evidente que, com o avanço da tecnologia multidisciplinar, haja um alcance maior na precisão diagnóstica, o que propicia um tratamento individualizado e eficaz, com boa relação custo-benefício [56, 57].

4.1 Biomarcadores

Os biomarcadores, utilizados nesta pesquisa, são apresentados a seguir.

1. **P16INK4-alfa**: proteína supressora de tumor, codificada pelo gene *CDKN2A*, que impede a progressão para a fase S do ciclo celular e inibe complexos quinase-dependentes. Nas infecções persistentes pelo vírus HPV de alto risco, há supressão da proteína retinoblastoma (pRb), como consequência da ação

modulada pela oncoproteína E7, o que leva à exacerbação do p16. Sendo assim, a expressão aumentada do p16 está diretamente relacionada à infecção de um HPV de alto risco. Sua coloração é pouco prevalente em lesões de baixo grau e não cora células epiteliais cervicais normais. Quando superexpressa, dá ao citoplasma uma coloração marrom [58].

Sua coloração também está na presença em lipossarcomas, linfomas, adenocarcinoma gástrico e pulmonar, carcinoma neuroendócrino e vem sendo cada vez mais utilizada em outros tumores ginecológicos [59].

Conforme o estudo LAST, o p16 deve ser utilizado para definir o diagnóstico diferencial de lesão de alto grau na morfologia de Hematoxilina-Eosina (HE), com lesões que mimetizam lesões de alto grau, atrofia, metaplasia escamosa e alterações epiteliais reparativas. Nos casos de NIC 2, quando há dúvidas entre a manifestação de infecção pelo HPV (LIEBG) ou uma lesão pré neoplásica (LIEAG), o p16 negativo é favorável a uma lesão de baixo grau ou doença não relacionada ao HPV, entretanto a superexpressão do marcador caracteriza a lesão de alto grau.

Assinala-se que não é recomendada de rotina, quando a avaliação histológica da biópsia for NIC 1 ou negativa, exceto quando a citologia for ASC-H, LIEAG e ASC-US com HPV 16+ [12, 60, 61].

Foi descrito pela primeira vez em 1983 e se expressa em todas as fases do ciclo celular ativo, exceto nas iniciais G0 e G1. É uma proteína nuclear que dá ao núcleo celular uma coloração vermelha. Sua expressão é proporcional ao índice mitótico, e a sua exacerbação está intimamente relacionada ao grau de proliferação celular. Apresenta-se na camada parabasal do epitélio escamoso estratificado da

cérvix. Quando existe a infecção pelo HPV de alto risco, observa-se a sua coloração em 2/3 do epitélio nas displasias moderadas e, em toda a sua espessura, nas displasias graves ou carcinoma *in situ* [62].

O Ki-67 é utilizado para diferenciar tumores malignos e benignos, como neuroendócrinos, hipofisários, sarcomas, preditor de mau prognóstico nos cânceres de bexiga e próstata, cordoma e em neoplasias mamárias, juntamente com ER, PR e HER [59, 63].

4.2 Protocolos utilizados para a realização das imuno-histoquímicas

1. Anticorpo: p16 INK4a (G175-405) Zeta Corporation

A reação imuno-histoquímica foi realizada na plataforma de automação Benchmark ULTRA® (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona).

1. As amostras, em bloco de parafina, foram cortadas em micrótomo regulado para 3µm, e cada lâmina recebeu, adicionalmente, um controle positivo.
2. A desparafinização foi realizada no equipamento pelo reagente EZ PREP.
3. A recuperação antigênica foi realizada com o tampão CC1 (*Cell Conditioning 1*), pH 9,0, a 100°C por 64 minutos.
4. O anticorpo primário anti p16, clone G175-405, da marca Zeta Corporation, foi incubado por 40 minutos na temperatura de 38°C.
5. Após a incubação do anticorpo primário, ocorreu a detecção da reação pelo sistema de detecção OptiView DAB IHC Detection Kit (mutímeros+ linker), utilizando o cromógeno diaminobenzidina (DAB), presente no *kit*.
6. As lâminas, então, foram contracoradas com hematoxilina de Mayer, diferenciadas com o *bluing reagent* (Li₂CO₃+ Na₂CO₃) e examinadas após desidratação e montagem.

2 Anticorpo: anti Ki67 (30-9) Roche

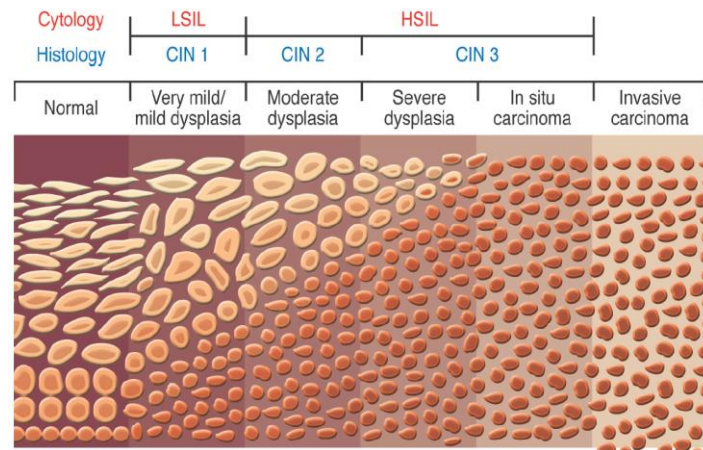
A reação imuno-histoquímica foi realizada na plataforma de automação Benchmark ULTRA® (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona).

1. As amostras, em bloco de parafina, foram cortadas em micrótomo regulado para 3µm, e cada lâmina recebeu, adicionalmente, um controle positivo.
2. A desparafinização foi realizada no equipamento pelo reagente EZ PREP.
3. A recuperação antigênica foi realizada com o tampão CC1 (*Cell Conditioning* 1), pH 9,0, a 95°C por 64 minutos, seguida do bloqueio da peroxidase, com o reagente Ultra View Universal DAB Inhibitor (H₂O₂ a 3%), presente no sistema de detecção.
4. O anticorpo primário anti Ki-67, clone (30-9), da marca Roche, foi incubado por 16 minutos na temperatura de 37°C.
5. Após a incubação do anticorpo primário, ocorreu a detecção da reação pelo sistema de detecção Ultra View Universal DAB *detection kit*, (mutímeros), utilizando o cromógeno diaminobenzidina (DAB), presente no *kit*.
6. As lâminas, então, foram contracoradas com hematoxilina de Mayer, diferenciadas com o *bluing reagent* (Li₂CO₃+ Na₂CO₃) e examinadas após desidratação e montagem.

Os estudos mostram que o ideal é que um marcador tenha 100% de sensibilidade e especificidade, mas ainda não foi possível encontrar nenhum com essas características [64].

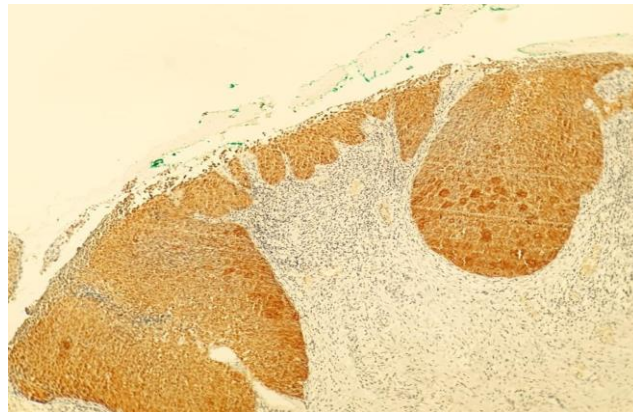
A seguir, são apresentadas a Figura 1, que trata da classificação das displasias cervicais; a Figura 2, da expressão imuno-histoquímica da proteína ki-67, detectada por anticorpos primários, resultado de uma coloração vermelha; a Figura 3, da expressão imuno-histoquímica da proteína p16, detectada por anticorpos primários, resultado de uma coloração marrom.

Figura 1 - Classificação das displasias cervicais.



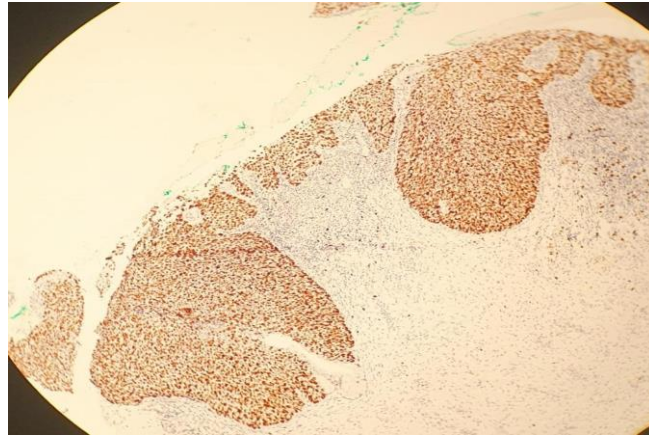
Fonte: Diretrizes Brasileiras para rastreamento do câncer do colo do útero (2016).

Figura 2 - Expressão imuno-histoquímica da proteína ki-67, detectada por anticorpos primários, resultado de uma coloração vermelha.



Fonte: Setor de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2021).

Figura 3- Expressão imuno-histoquímica da proteína p16, detectada por anticorpos primários, resultado de uma coloração marrom.



Fonte: Setor de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2021).

JUSTIFICATIVA

A identificação de biomarcadores em lesões intraepiteliais de mulheres jovens pode auxiliar na decisão de tratamentos mais conservadores.

HIPÓTESES

Hipótese nula

P16 e Ki67 não auxiliam no diagnóstico e no prognóstico de lesões precursoras em mulheres com até 30 anos.

Hipótese alternativa

P16 e Ki67 são biomarcadores que auxiliam no diagnóstico e determinam o prognóstico de lesões precursoras em mulheres com até 30 anos.

OBJETIVOS

Principal

- Determinar a expressão de p16 e Ki67 nas lesões intraepiteliais de alto grau em pacientes com idade igual ou inferior a 30 anos.

Secundários

- Relacionar a expressão de positividade de p16 com a expressão de positividade de Ki-67.
- Correlacionar a expressão de p16 e Ki-67 com as variáveis clínicas e com desfecho – recidiva ou progressão

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. Rio de Janeiro: INCA, 2016. [acesso em: maio 2021]. Disponível em: http://www.citologiaclinica.org.br/site/pdf/documentos/diretrizes-para-o-rastreamento-do-cancer-do-colo-do-utero_2016.pdf
2. World Health Organization. Director-General calls for all countries to take action to help end the suffering caused by cervical cancer. Accelerating cervical cancer elimination. Geneva: Who, 2018. [acesso em: 16 abr. 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/reproductivehealth/call-to-action-elimination-cervical-cancer/en/>
3. Buskwofie A, David-West G, Clare CA. A Review of Cervical Cancer: Incidence and Disparities. J Natl Med Assoc. 2020 Apr;112(2):229-232. doi: 10.1016/j.jnma.2020.03.002. Epub 2020 Apr 8. PMID: 32278478.
4. International Agency for Research on Cancer. Cancer today. IARC. 2020. [acesso em: 1 out. 2021]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/>
5. Instituto do Câncer. Câncer do colo de útero. Ministério da Saúde: INCA, 2021. [acesso em: 27 dec. 2021]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>
6. Olusola P, Banerjee HN, Phillely JV, Dasgupta S. Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. Cells. 2019 Jun 21;8(6):622. doi: 10.3390/cells8060622. PMID: 31234354; PMCID: PMC6628030.
7. Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. Semin Oncol Nurs. 2019 Apr;35(2):166-174. doi: 10.1016/j.soncn.2019.02.003. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30878194.
8. World Health Organization. Launch of the Global Strategy to Accelerate the Elimination of Cervical Cancer. Geneva: Who, 2020. [acesso em: 15 set. 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/events/detail/2020/11/17/default-calendar/launch-of-the-global-strategy-to-accelerate-the-elimination-of-cervical-cancer>
9. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC; Members of the LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions:

background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol.* 2013 Jan;32(1):76-115. doi: 10.1097/PGP.0b013e31826916c7. Erratum in: *Int J Gynecol Pathol.* 2013 Jul;32(4):432. Erratum in: *Int J Gynecol Pathol.* 2013 Mar;32(2):241. PMID: 23202792.

10. Shrestha AD, Neupane D, Vedsted P, Kallestrup P. Cervical Cancer Prevalence, Incidence and Mortality in Low and Middle Income Countries: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 Feb 26;19(2):319-324. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.2.319. PMID: 29479954; PMCID: PMC5980914.
11. Silva VR. O impacto da marcação imuno-histoquímica para p16 e Ki-87 na reprodutibilidade diagnóstica das biópsias do colo uterino. [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, 2017. [acesso em: 16 out. 2021]. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/25222/2/viviane_silva_iff_mest_2017.pdf
12. Gravitt, Patti E, and Rachel L Winer. "Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency." *Viruses*, 2017 Sep., 9 (10):267. 21. doi:10.3390/v9100267.
13. Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, Goldstein AT. Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future. *Sex Med Rev.* 2020 Jan;8(1):28-37. doi: 10.1016/j.sxmr.2019.09.005. Epub 2019 Nov 30. PMID: 31791846.
14. Daily LR, Erickson BK, Pasko DN, Straughn JM Jr, Huh WK, Leath CA 3rd. High Rates of High-Grade Cervical Dysplasia in High-Risk Young Women with Low-Grade Cervical Cytology. *J Low Genit Tract Dis.* 2018;22(3):207-211. doi:10.1097/LGT.0000000000000381
15. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO). Lesões pré-invasivas da vulva, da vagina e do colo uterino. São Paulo: FEBRASGO; 2021. (Protocolo FEBRASGO - Ginecologia, n. 7/ Comissão Nacional Especializada em Ginecologia Oncológica). [acesso em: 5 out. 2021]. Disponível em: <https://sogirgs.org.br/area-do-associado/Lesoes-pre-invasivas-da-vulva-da-vagina-e-do-colo-uterino-2021.pdf>
16. Stanley M. HPV vaccines: alternative dosage schedules. *Expert Rev Vaccines.* 2019 Dec;18(12):1309-1316. doi: 10.1080/14760584.2019.1704261. Epub 2019 Dec 26. PMID: 31847625.
17. Oyervides-Muñoz MA, Pérez-Maya AA, Rodríguez-Gutiérrez HF, Gómez-Macias GS, Fajardo-Ramírez OR, Treviño V, Barrera-Saldaña HA, Garza-Rodríguez ML.

- Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infect Genet Evol.* 2018 Jul;61:134-144. doi: 10.1016/j.meegid.2018.03.003. Epub 2018 Mar 6. PMID: 29518579
18. Yuan Y, Cai X, Shen F, Ma F. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer. *Cancer Lett.* 2021 Jan 28;497:243-254. doi: 10.1016/j.canlet.2020.10.034. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33122098.
 19. Wang H-Y, Kim H, Park KH. "Diagnostic performance of the E6/E7 mRNA-based Optimygene HR-HPV RT-qDx assay for cervical cancer screening". *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 78 (2019): 22-30. doi: 10.1016/j.ijid.2018.09.014
 20. Soheili M, Keyvani H, Soheili M, Nasserli S. Human papilloma virus: A review study of epidemiology, carcinogenesis, diagnostic methods, and treatment of all HPV-related cancers. *Med J Islam Repub. Iran.* 2021 May 22; 35:65. doi: 10.47176/mjiri.35.65. PMID: 34277502; PMCID: PMC8278030.
 21. Hoffman BL, Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Bradshaw KD, Cunningham FG. *Ginecologia de Williams*. Porto Alegre: Artmed. 2. ed. 2014.
 22. Soheili M, Keyvani H, Soheili M, Nasserli S. Human papilloma virus: A review study of epidemiology, carcinogenesis, diagnostic methods, and treatment of all HPV-related cancers. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran.* 2021, 35(1) doi: <https://doi.org/10.47176/mjiri.35.65>
 23. Wang H-Y, Park S, Lee D, Kim S, Kim G, Park KH, Lee, H. "Prevalence of Type-specific Oncogenic Human Papillomavirus Infection Assessed by HPV E6/E7 mRNA Among Women with High-grade Cervical Lesions." *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 37, 2015; 135:42. [acesso em: 15 nov. 2021] Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(15\)00154-X/fulltext#secsect0130](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(15)00154-X/fulltext#secsect0130) doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.06.018>
 24. Martins NV, Campaner AB, Parellada CI., Ribalta JCL. *Patologia do trato genital inferior: diagnóstico e tratamento*. 2. ed. São Paulo: Roca; 2014.
 25. Syler LB, Stobaugh CL, Foulis PR, Carlton GT, DeLand LA, Borkowski AA. Cervical Cancer Screening in South Florida Veteran Population, 2014 to 2020: Cytology and High-Risk Human Papillomavirus Correlation and Epidemiology. *Cureus.* 2021 Aug 17;13(8):e17247. doi: 10.7759/cureus.17247. PMID: 34540473; PMCID: PMC8445854.
 26. Fontham ETH, Wolf AMD, Church TR, Etzioni R, Flowers CR, Herzig A, Guerra CE, Oeffinger KC, Shih YT, Walter LC, Kim JJ, Andrews KS, DeSantis CE,

- Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, Wender RC, Smith RA. Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin.* 2020 Sep;70(5):321-346. doi: 10.3322/caac.21628. Epub 2020 Jul 30. PMID: 32729638.
27. Sundström K, Elfström KM. Advances in cervical cancer prevention: Efficacy, effectiveness, elimination? *PLoS Med.* 2020 Jan 28;17(1):e1003035. doi: 10.1371/journal.pmed.1003035. PMID: 31990905; PMCID: PMC6986699.
 28. Santesso N, Mustafa RA, Schünemann HJ, Arbyn M, Blumenthal PD, Cain J, Chirenje M, Denny L, De Vuyst H, Eckert LO, Forhan SE, Franco EL, Gage JC, Garcia F, Herrero R, Jeronimo J, Lu ER, Luciani S, Quek SC, Sankaranarayanan R, Tsu V, Broutet N; Guideline Support Group. World Health Organization Guidelines for treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2-3 and screen-and-treat strategies to prevent cervical cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2016 Mar;132(3):252-8. doi: 10.1016/j.ijgo.2015.07.038. Epub 2015 Dec 14. PMID: 26868062.
 29. Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med.* 2018 Oct;7(10):5217-5236. doi: 10.1002/cam4.1501. Epub 2018 Sep 14. PMID: 30589505; PMCID: PMC6198240.
 30. Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, Bryant A, Martin-Hirsch PP, Mustafa RA, Schünemann H, Paraskevaidis E, Arbyn M. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Aug 10;8(8):CD008587. doi: 10.1002/14651858.CD008587.pub2. PMID: 28796882; PMCID: PMC6483676.
 31. Cooper DB, Goyal M. Colposcopy. 2021 Jul 18. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 33232095.
 32. Burness JV, Schroeder JM, Warren JB. Cervical Colposcopy: Indications and Risk Assessment. *Am Fam Physician.* 2020 Jul 1;102(1):39-48. PMID: 32603071.
 33. Tota JE, Bentley J, Blake J, Coutlée F, Duggan MA, Ferenczy A, Franco EL, Fung-Kee-Fung M, Gotlieb W, Mayrand MH, McLachlin M, Murphy J, Ogilvie G, Ratnam S. Introduction of molecular HPV testing as the primary technology in cervical cancer screening: Acting on evidence to change the current paradigm. *Prev Med.* 2017 May; 98:5-14. doi: 10.1016/j.ypmed.2016.11.029. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28279264
 34. Tsikouras P, Zervoudis S, Manav B, Tomara E, Iatrakis G, Romanidis C, Bothou A, Galazios G. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. *J BUON.* 2016 Mar-Apr;21(2):320-5. PMID: 27273940.

35. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N; ESMO Guidelines Committee. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;28(suppl_4):iv72-iv83. doi: 10.1093/annonc/mdx220. Erratum in: *Ann Oncol*. 2018 Oct 1;29(Suppl 4):iv262. Erratum in: *Ann Oncol*. 2018 Oct;29 Suppl 4:iv262. PMID: 28881916.
36. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, Chelmow Chelmow Chelmow D, Einstein MH, Garcia F, Huh WK, Kim JJ, Moscicki AB, Nayar R, Saraiya M, Sawaya GF, Wentzensen N, Schiffman M; 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines Committee. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis*. 2020 Apr; 24(2):102-131. doi: 10.1097/LGT.0000000000000525. Erratum in: *J Low Genit Tract Dis*. 2020 Oct;24(4):427. PMID: 32243307; PMCID: PMC7147428.
37. Brown AJ, Trimble CL. New technologies for cervical cancer screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012 Apr;26(2):233-42. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2011.11.001. Epub 2011 Nov 25. PMID: 22119058; PMCID: PMC3632360
38. Weston G, Dombrowski C, Harvey MJ, Iftner T, Kyrgiou M, Founta C, Adams EJ. Use of the Aptima mRNA high-risk human papillomavirus (HR-HPV) assay compared to a DNA HR-HPV assay in the English cervical screening programme: a decision tree model based economic evaluation. *BMJ Open*. 2020 Mar 8;10(3):e031303. doi: 10.1136/bmjopen-2019-031303. PMID: 32152154; PMCID: PMC7064071.
39. Mayeux EJ, Cox JT. *Tratado e Atlas Colposcopia Moderna*. ASCCP. Mundim FD, tradutor. 3. ed. Rio de Janeiro: Di Livros; 2014.
40. Smith RA, Andrews KS, Brooks D, Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, Wender RC. Cancer screening in the United States, 2019: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*. 2019 May;69(3):184-210. doi: 10.3322/caac.21557. Epub 2019 Mar 15. PMID: 30875085.
41. Hillemanns P, Soergel P, Hertel H, Jentschke M. Epidemiology and Early Detection of Cervical Cancer. *Oncol Res Treat*. 2016;39(9):501-6. doi: 10.1159/000448385. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27614953.
42. Phoolcharoen, Natacha et al. "American Society of Clinical Oncology (ASCO) Cervical Cancer Prevention Program: A Hands-On Training Course in Nepal." *JCO Global Oncology*. 2021, 7: 204-209. doi:10.1200/GO.20.00513

43. Vu M, Yu J, Awolude OA, Chuang L. Cervical cancer worldwide. *Curr Probl Cancer*. 2018 Sep;42(5):457-465. doi: 10.1016/j.currprobcancer.2018.06.003. Epub 2018 Jun 25. PMID: 30064936.
44. Basu P, Taghavi K, Hu SY, Mogri S, Joshi S. Management of cervical premalignant lesions. *Curr Probl Cancer*. 2018 Mar-Apr;42(2):129-136. doi: 10.1016/j.currprobcancer.2018.01.010. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29428790.
45. Fowler Jr., Maani EV, Jack BW. Cervical Cancer. 2021 Jul 7. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 28613745.
46. Calderón Masón DF. Diagnóstico y tratamiento de las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado del cuello uterino - Diagnosis and treatment of high grade squamous intraepithelial lesions of uterine cervix - *Cambios Rev. Méd.* 2019, 18(1):76-84. [acesso em: 18 jul. 2021]. Disponível em: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/08/1015165/revista_cambios_enero_unio_2019_n18_1_76-84.pdf
47. Hurtado-Roca Y, Becerra-Chauca N, Malca, M. Efficacy and safety of cryotherapy, cold cone or thermocoagulation compared to LEEP as a therapy for cervical intraepithelial neoplasia: Systematic review. *Revista de Saúde Pública [online]*. 2020, 54. [Acesso em: 26 set. 2021]. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2020054001750>>. ISSN 1518-8787.
48. World Health Organization. Papillomavirus and cervical cancer. Geneva: WHO, 2022. [acesso em 20 fev. 2022]. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
49. Brisson M, Kim JJ, Canfell K, Drolet M, Gingras G, Burger EA, Martin D, Simms KT, Bénard É, Boily MC, Sy S, Regan C, Keane A, Caruana M, Nguyen DTN, Smith MA, Laprise JF, Jit M, Alary M, Bray F, Fidarova E, Elsheikh F, Bloem PJN, Broutet N, Hutubessy R. Impact of HPV vaccination and cervical screening on cervical cancer elimination: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. *Lancet*. 2020 Feb 22;395(10224):575-590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30068-4. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32007141; PMCID: PMC7043009.
50. Brisson M, Drolet M. Global elimination of cervical cancer as a public health problem. *Lancet Oncol*. 2019 Mar; 20(3):319-321. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30072-5. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30795952
51. Ferro AB. Imunohistoquímica. [Internet] Autor; 2014. [acesso em 15 dez. 2021]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.21/4569>.

52. Sukswai N, Khoury JD. Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr Hematol Malig Rep.* 2019 Oct;14(5):368-375. doi: 10.1007/s11899-019-00533-9. PMID: 31338668
53. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine*, 1941, 47:200-202. doi: <https://doi.org/10.3181/00379727-47-13084p>
54. Wu L, Qu X. Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges. *Chem Soc Rev.* 2015 May 21;44(10):2963-97. doi: 10.1039/c4cs00370e. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25739971.
55. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* 2018 Oct;143 Suppl 2:22-36. doi: 10.1002/ijgo.12611. PMID: 30306584.
56. Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism.* 2015 Mar;64(3 Suppl 1):S16-21. doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.027. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25468140
57. García, Alejandro; Falcoff, Nora; Di Camillo, Norma; Sartor, Beatriz; Catanese, María; Denninghoff, Valeria. - Inmunohistoquímica de la proteína p16INK4a en biopsias y extendidos cervicovaginales y su relación con HPV por PCR - *Medicina (Buenos Aires)*; 68(6); 428-432; 2008-12
58. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Experimental cell research.* 1997, 237(1); 7–13. doi: <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3824>
59. Hodgson A, Parra-Herran C. Site p. 16. [acesso em 25 set. 2021]. Disponível em: [PathologyOutlines.com. https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsp16.html](https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsp16.html)
60. García A, Falcoff N; Di Camillo N, Sartor B, Catanese, M, Denninghoff, V. Inmunohistoquímica de la proteína p16INK4a en biopsias y extendidos cervicovaginales y su relación con HPV por PCR - *Medicina (Buenos Aires)*; 2008-12, 68(6), 428-432. [acesso em: 18 dez. 2021]. Disponível em: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revciemedhab/cmh-2015/cmh151o.pdf>
61. Shain AF, Kwok S, Folkins AK, Kong CS. Utility of p16 Immunohistochemistry in Evaluating Negative Cervical Biopsies Following High-risk Pap Test Results. *Am J Surg Pathol.* 2018 Jan;42(1):69-75. doi: 10.1097/PAS.0000000000000960. PMID: 29112019.
62. Dal-Toé de Pra, Samira; Yumi Kakitani Uchida, Fabiane; Fernanda Delani, Aline; Flach de Goes, Eduarda. - Métodos biomoleculares em caso de lesão intraepitelial cervical de alto grau - *Biomolecular methods in case of high-grade*

cervical intraepithelial injury. Rev. Bras. Anal Clin. 2021; 53(1): 9-14. [acesso em: 15 dez. 2021]. Disponível em: http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2021/08/RBAC-vol-53-1-2021_art01_ref1989.pdf

63. Silva DC, Gonçalves AK, Cobucci RN, Mendonça RC, Lima PH, Cavalcanti Jr. G. Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions - A systematic review. Pathol Res Pract. 2017 Jul;213(7):723-729. doi: 10.1016/j.prp.2017.03.003. Epub 2017 Mar 14. PMID: 28554769.
64. Melo, FLP, Lancellotti CLP, Silva, MALG. Expression of the Immunohistochemical Markers p16 and Ki-67 and Their Usefulness in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasms. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia [online]. 2016, v. 38, n. 2 [acesso em 11 set. 2021], pp. 82-87. Disponível em: <<https://doi.org/10.1055/s-0036-1571470>>. ISSN 1806-9339. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571470>.

ARTIGO

Expression of P16 and Ki-67 in cervical high-grade squamous intraepithelial lesion
up to 30 years old, in South of Brazil

Giovana Fontes Rosin¹, Suzana Arenhart Pessini, Valentino Antônio Magno

1. Graduate Program in Health Sciences: Gynecology and Obstetrics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence to:

Giovana Fontes Rosin

Rua Dona Eugênia, 1264, Santa Cecília.

Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +5551995961363

E-mail: gifrosin@hotmail.com

Abstract

Background: Immunohistochemistry is a technique that evaluates the association of biomarkers with morphological changes, offering higher level of reproducibility, sensitivity and specificity in the diagnosis of various neoplasms, with p16, associated with high-risk HPV and Ki-67 with cell multiplication. **Objective:** To determine the expression of p16 and Ki67 in high-grade intraepithelial lesions in patients aged 30

years or younger and correlate with clinical variables and relapse or progression.

Methods: Retrospective cross-sectional study, in women diagnosed with HSIL, treated at the gynecology outpatient clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, from April 2004 to April 2016. **Results:** Were evaluated 68 patients. The median (md) age of the was 27 years and 47 (69.1%), non-smokers. Only 21 (30.9%) of them had finished High School and 5 (7.4%) had Higher Education. Considering the histological characteristics, among the patients, 53 (77.9%) had the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 3, and 15 (22.1%), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2. Almost all were positive for p16INK4a and Ki67 (97.1% and 98.5%, respectively) and 65 (95.6%) were discharged from the outpatient clinic, and only 1 (1.5%) had a recurrence of the lesion during follow-up. P16INK4a and Ki67 were positively related (Spearman, $\rho=0.702$, $p\leq 0.001$). The analyzes showed neither correlation between p16 and Ki67 with the variables of interest (age, parity, smoking and immunosuppression) nor with clinical outcome (recurrence or progression). **Conclusion:** P16 and Ki67 biomarkers did not help in the diagnosis and prognosis of precursor lesions in women aged up to 30 years.

Keywords: High-grade cervical intraepithelial lesion; Cervical cancer; HPV; Biomarkers; p16, Ki-67.

Introduction

High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) are associated with persistent infection by human papillomavirus virus (HPV). Of an oncogenic subtype in 70% of the

cases HPV 16 and 18, and are the precursor lesions of cervical cancer. [1, 2]. Approximately 5% of CIN 2 and 15% of CIN 3 will progress to an invasive lesion. [3, 4] Treating CIN when necessary and performed in a timely manner, the cure rate is approximately 100%. [5] It is only by HPV vaccination programs, organized screening, and appropriate treatment of pre-invasive lesions that a positive impact on cervical cancer incidence and mortality can be achieved. [6, 7, 8, 9]

Cervical cancer is the fourth most common malignancy among women worldwide. The global incidence rate is 15.6/100,000 women, ranging from 7.2 in Australia to 51/100.00 in Mozambique. [7, 10, 12, 13] In Brazil, the estimative of new cases was 16,710, and 6,596 deaths in the year 2020. [14]

Immunohistochemistry is a technique that evaluates the association of biomarkers with morphological changes, offering greater reproducibility, sensitivity and specificity in the diagnosis. [15] The p16 biomarker is used by many pathologists to make the diagnosis of HSIL more efficient, and its staining is overexpressed in infections, caused by a high-risk of HPV. Ki-67 is expressed in all phases of the active cell cycle, except for the initial G0 and G1. [16] Its exacerbation is closely associated with the rate of cell multiplication. [17, 18] According to the criteria, defined by the LAST project (The Lower Anogenital Squamous Terminology) of the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) and The College of American Pathologists (CAP), to reclassify an HPV-associated lesion, LIEAG in LIEBG with regard to immunohistochemistry for p16, if negative, favors clinical follow-up, avoiding, therefore, unnecessary surgeries, especially in young patients, in which follow-up might influences their reproductive future. [19, 20, 21, 22]

The objective of this study was to associate the expression of these markers in the HSIL in young (less than 30 years old) patients.

Methods

It was a retrospective cross-sectional study, carried out with women diagnosed histologically with HSIL, treated at the gynecology outpatient clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a tertiary university hospital in South of Brazil, from April 2004 to April 2016. Patients aged up to 30 years or under were selected, with histological diagnosis of HSIL.

The immunohistochemical reaction was performed on the Benchmark ULTRA® automation platform (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona): Antibody p16 INK4a (G175-405) Zeta Corporation: As a sample, they were cut into a paraffin block on a microtome set to 3µm, and each slide additionally received a positive control. Dewaxing was performed on the instrument using the EZ PREP reagent. Antigen retrieval was performed with the conditioner CC1 (Cell Conditioning 1), pH 9.0, at 100°C for 64 minutes. The primary anti p16 antibody, clone G175-405, from Zeta Corporation, was incubated for 40 minutes at 38°C. After the primer incubation, the reaction was detected by the OptiView DAB IHC Detection Kit detection system (multimers+ linker), using the chromogen diaminobenzidine (DAB). The slides, then, with differentiated Mayer differentiation, with Mayer blution reagents (LiCO₃+ Na₂) and examinations with the slides after separation were assembled. Antibody: anti Ki67 (30-9) Roche: The samples, in paraffin block, were cut in a microtome set to 3µm, and

each slide additionally received a positive control. Deparaffinization was performed on the instrument using the EZ PREP reagent. Antigen retrieval was performed with CC1 buffer (Cell Conditioning 1), pH 9.0, at 95°C for 64 minutes, followed by peroxidase blocking, with the Ultra View Universal DAB Inhibitor reagent (3% H₂O₂), present in the detection system. The primary anti Ki-67 antibody, clone (30-9), Roche brand, was incubated for 16 minutes at 37°C. After the incubation of the primary antibody, the reaction was detected by the Ultra View Universal DAB detection kit (multimer) detection system, using the chromogen diaminobenzidine (DAB), present in the kit. The slides were then counterstained with Mayer's hematoxylin, differentiated with the bluing reagent (Li₂CO₃+ Na₂CO₃) and examined after dehydration and mounting.

All immunohistochemistry slides were reanalyzed by two pathologists from the Department of Pathology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Demographic and clinical data (age, diagnosis, education, parity, smoking, comorbidities, and immunosuppression) and follow-up for 12 and 24 months after treatment were collected from the hospital records. Patients with LSIL, atrophy, metaplasia and 3 patients with squamous cell carcinoma were excluded.

Data were input in the SPSS program, version 18.0 [SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.]. Descriptive analyzes were expressed by measures of central tendency and dispersion: for quantitative variables by means \pm standard errors of means (\pm SME) or by medians (md) and interquartile ranges (IQR, 25th and 75th percentiles), according to the

Shapiro-Wilk normality test, for qualitative variables by absolute (n) and relative (%) frequencies. To identify possible associations between qualitative variables of interest, the Chi-squared test was used, with adjusted residual analyses. Besides, Spearman correlations were conducted between the variables of interest in the study. In all analyses, the significance level was set at 5%.

Results

Considering all previously analyzed patients (N=110). Of these, 21 (19.1%) of the histological slides were unavailable for analysis. In addition, another 21 (19.1%) were excluded because they did not meet all the inclusion criteria: (2, due to wear of the histological slides; 1, presence of artifact or pre-analytical defect of fixation; 1, atrophy; 1, low-grade lesion; 3, squamous cell carcinoma; and 13, metaplasia). Therefore, the final sample analyzed consisted of 68 patients. (Figure 1).

The median (IQR) age at diagnosis was 27.0 (18.0 – 29.0) years, ranging from 18 to 30 years. Most patients were self-declared non-smokers (69.1%), multiparous (35.3%) or primiparous (39.7%), with incomplete Elementary School (35.3%) or complete High School (30.9%) in relation to educational level. Considering the total, 17 (23.9%) women had some comorbidity, namely: 10 (14.7%), HIV/AIDS; 3 (4.4%), hepatitis C; 2 (2.9%), systemic arterial hypertension; 2 (2.9%), epilepsy; 1 (1.5%), diabetes mellitus; 1 (1.5%), Crohn's disease. Of the total, 11 (16.2%) had immunosuppression, namely: 10 (14.7%), HIV/AIDS; 1 (1.5%), Crohn's disease; and 11 (16.2%), immunosuppression (Table 1).

The histological characteristics, 53 (77.9%) patients had cervical intraepithelial neoplasia CIN 3, and 15 (22.1%), CIN 2. Almost all had positive P16INK4a and Ki-67, that is, 66 (97.1%), and 67 (98.5%), respectively. Eventually, 65 (95.6%) were discharged from the outpatient clinic, and only 1 (1.5%) relapsed during follow-up. Three (4.4%) did not undergo follow-up after diagnosis (Table 2).

Patients with CIN 2 were discharged from the outpatient clinic after a follow-up of 12-24 months without recurrence. Only one of the patients with CIN 3 relapsed during follow-up. She had positive immunohistochemistry for both markers, and multiparity was the only risk factor she had. She received additional surgical treatment and, at follow-up, was discharged from the outpatient clinic.

The analyzes did not show correlations between any of the variables of interest (age, age less than or equal to 30 years, parity, smoking and immunosuppression) with the markers studied (P16INK4a and Ki-67 positive), and there was no correlation between recurrence or progression of disease (Spearman correlations, $p > 0.05$ for all analyses). Apart from that, P16INK4a and Ki-67 were positively related (Spearman, $\rho = 0.702$, $p \leq 0.001$) (Table 3).

Discussion

Based on the results, 68 women with a median age of 27 years were evaluated. It was observed that immunohistochemistry, for the focused markers, was positive in most of the pieces analyzed, as 66 (97.2%) were positive for p16, and 67 (98.6%), for

Ki-67. The staining for p16 was negative in only 2 (2.8%) CIN 3, and among these, 1 (1.4%) was also negative for Ki-67.

Regarding the number of patients with HSIL, we had a small sample when compared to a study carried out in 2016, in Western Australia, based on the Western Australian Data Linkage System. During a 10-year period, the incidence of HSIL was much higher, 2,692 patients aged 18 to 24 years had histological diagnosis (CIN 2), but 59.5% had spontaneous resolution of the lesion in 24 months of clinical follow-up without the need for surgery. In our research, only 15 patients were diagnosed with CIN 2 and all underwent surgery. [4]

Unlike our results, a study carried out in India for the International Agency for Research on Cancer (IARC) from 2010 to 2015 selected patients between 30 and 60 years old, healthy and not pregnant. They underwent screening with hybrid capture (HR-HPV test) and inspection of the cervix with acetic acid, those who had both tests positive underwent colposcopy and biopsy as needed. Women diagnosed with CIN (CIN 1=128; CIN 2=68; CIN 3=52) were selected for the p16 and Ki-67 immunostaining. Slides were analyzed in France by a gynecological pathologist. A small amount of immunohistochemistry was found for p16 and Ki-67 positive, 24.4% for CIN 1 and a greater amount 47.6% positive for CIN 2 and 60.5% for CIN 3. They concluded that immunohistochemistry as a technique adjuvant can improve diagnostic accuracy in routine histopathology and concluded that dual staining can be used as an auxiliary tool to improve diagnostic accuracy. [23] Likewise, in the Certain study (In the CERvical Tissue Adjunctive aNalysis), 1100 biopsies diagnosed with CIN2/3 divided into 275 cases by stratified randomization were evaluated. All HE slides were read by 17 to 18

surgical pathologists. And after carrying out the immunohistochemistry of p16 and rereading by the least specialists. There was an improvement in diagnostic agreement by 4.7%, driven by an increase in sensitivity and specificity, 11.5 and 3% respectively, ensuring better treatment without treating more patients. [24].

However, during a first phase of this study, where all immunohistochemistry tests were positive, Stoler et al criticized this system, which prioritized the costs of immunohistochemistry rather than considering the clinical importance for patients, what is best for them and what is needed for them. Findings and conclusions compatible with our analyses.

In both studies mentioned above, immunohistochemistry improved diagnostic reproducibility, but we could not reach the same finding because immunohistochemistry was positive for most analyses, which has no statistical value for such a statement.

Only 1 patient relapsed during follow-up and, therefore, immunohistochemistry was not found to be a risk factor for relapse or progression. Unlike our analyses, a survey carried out in Italy in 2021 by Lukic and colleagues evaluated 62 patients under the age of 35 years. All with histological diagnosis of CIN 2, 31 (50%) of them with positive immunohistochemistry for P16 and the other half negative. After 2 years of treatment 19.4% had LSIL and 6.5% HSIL on cytology. In 5 years of follow-up: 9.7% of the patients progressed from CIN 2 to CIN 3. Of the patients who presented negative P16, none progressed. And after 2 years of treatment 3.2% had LSIL on cytology. They found a higher risk of persistence, recurrence and greater progression from CIN 2 to CIN 3, when p16 is positive. [25]

It is possible that there are higher chances of recurrence or progression when immunohistochemistry is positive for both markers, so surgical treatment is more appropriate than clinical follow-up, even in young patients.

Our study was carried out with a small number of patients, all of whom had a histological diagnosis of CIN 2/3, or which may have been a delimiting fact for our analyses.

Conclusion

Most patients were positive immunohistochemistry for both markers, and there was no correlation with clinical outcome. Although the staining was positive in the markers, the use of this technique is not justified, considering the additional cost generated to the Health System. We expected a greater number of negative immunohistochemical tests because patients under 30 years of age were analyzed. A future study with a larger sample is necessary for more accurate results.

Conflict of interest: We declare that we have no conflicts of interest.

References

1. Melnikow J, Henderson JT, Burda BU, Senger CA, Durbin S, Soulsby MA. Screening for Cervical Cancer With High-Risk Human Papillomavirus Testing: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. Evidence Synthesis No. 158. AHRQ Publication No. 17-05231-EF-1. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; 2018.
2. Bhatla N, Aoki D, Sharma D, Sankaranarayanan D. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *Int J Gynecol Obstet.* 2021;155(Suppl. 1):28–44.
3. Sundström K, Elfström KM. Advances in cervical cancer prevention: Efficacy, effectiveness, elimination? *PLoS Med.* 2020 Jan 28;17(1):e1003035. doi: 10.1371/journal.pmed.1003035. PMID: 31990905; PMCID: PMC6986699
4. Munro A, Powell RG, A Cohen P, Bowen S, Spilsbury K, O'Leary P, Semmens JB, Codde J, Williams V, Steel N, Leung Y. Spontaneous regression of CIN2 in women aged 18-24 years: a retrospective study of a state-wide population in Western Australia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2016 Mar;95(3):291-8. doi: 10.1111/aogs.12835. Epub 2016 Jan 17. PMID: 26660398.
5. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, Alameda F, Keller T, Rehm S, Ridder R; PALMS Study Group. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol.* 2015 Jun;123(6):373-81. doi: 10.1002/cncy.21542. Epub 2015 Apr 17. PMID: 25891096
6. Bravo PE, Águila Rodríguez N, Guerra Villarpanda D, Blanco Vázquez Y, Rodríguez González O, Oliva Santana M. Cáncer cérvico uterino: prevención y tratamiento. *Medisur [Internet].* 2020 Ago; 18(4): 685-693. [cited 2021 Dec. 14].

Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2020000400685&lng=es. Epub 02-Ago-2020.

7. Soca Gallego L, Dominguez A, Parmar M, Human Papilloma, VV. 2021 Sep 14. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 32965857.
8. Wang R, Pan W, Jin L, Huang W, Li Y, Wu D, Gao C, Ma D, Liao S. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Lett.* 2020 Feb 28;471:88-102. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.039. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31812696.
9. El-Zein M, Richardson L, Franco EL. Cervical cancer screening of HPV vaccinated populations: Cytology, molecular testing, both or none. *J Clin Virol.* 2016;76 Suppl 1(Suppl 1):S62-S68. doi:10.1016/j.jcv.2015.11.020
10. International Agency for Research on Cancer. Cancer today. IARC. 2020. [cited 2021 Oct 15]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/>
11. Instituto do Câncer. Câncer do colo de útero. Ministério da Saúde: INCA, 2021. [cited 2021 Dec. 27]. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>
12. Soca Gallego L, Dominguez A, Parmar M, Human Papilloma, VV. 2021 Sep 14. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 32965857.
13. Thuler, Luiz Claudio Santos, Aguiar, Suzana Sales de e Bergmann, Anke Determinantes do diagnóstico em estadió avançado do câncer do colo do útero no Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia [online].* 2014,

36(6):pp. 237-243. doi <<https://doi.org/10.1590/S0100-720320140005010>>. ISSN 1806-9339

14. Popiel A, Piotrowska A, Sputa-Grzegorzolka P, Smolarz B, Romanowicz H, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Kobierzycki C. Preliminary Study on the Expression of Testin, p16 and Ki-67 in the Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Biomedicines*. 2021 Aug 13;9(8):1010. doi: 10.3390/biomedicines9081010. PMID: 34440214; PMCID: PMC8391355
15. Sukswai N, Khoury JD. Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019 Oct;14(5):368-375. doi: 10.1007/s11899-019-00533-9. PMID: 31338668.
16. Bergeron C, Ordi JO, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder. For the European CINtec Histology Study Group, Conjunctive p16^{INK4a} Testing Significantly Increases Accuracy in Diagnosing High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia, *American Journal of Clinical Pathology*, March 2010, 133(3): 395–406, doi: <https://doi.org/10.1309/AJCPXSVCDZ3D5MZM>
17. 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*. 2016;17(7):3201-6. PMID: 27509952.
18. Silva VR. O impacto da marcação imuno-histoquímica para p16 e Ki-87 na reprodutibilidade diagnóstica das biópsias do colo uterino. [dissertação]. Fundação Oswaldo Cruz: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, 2017 . [cited 2021 Dec. 27].

Available from:

https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/25222/2/viviane_silva_iff_mest_20

19. Melo FLP, Lancellotti CLP, Silva, MALG. Expression of the Immunohistochemical Markers p16 and Ki-67 and Their Usefulness in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasms. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* [online]. 2016, 38(2): 82-87. Doi: <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571470>.
20. Nuovo GJ, de Andrade CV, Wells SI, Brusadelli M, Nicol AF. New biomarkers of human papillomavirus infection in acute cervical intraepithelial neoplasia. *Ann Diagn Pathol*. 2018 Oct;36:21-27. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2018.06.008. Epub 2018 Jun 22. PMID: 29966832.
21. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC; Members of the LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol*. 2013 Jan;32(1):76-115. doi: 10.1097/PGP.0b013e31826916c7. Erratum in: *Int J Gynecol Pathol*. 2013 Jul;32(4):432. Erratum in: *Int J Gynecol Pathol*. 2013 Mar;32(2):241. PMID: 23202792.
22. Clark JL, Lu D, Kalir T, Liu Y. Overdiagnosis of HSIL on cervical biopsy: errors in p16 immunohistochemistry implementation. *Hum Pathol*. 2016 Sep;55:51-6. doi: 10.1016/j.humpath.2016.04.010. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27134110.

23. Mandal R, Ghosh I, Banerjee D, Mittal S, Muwonge R, Roy C, Panda C, Vernekar M, Frappart L, Basu P. Correlation Between p16/Ki-67 Expression and the Grade of Cervical Intraepithelial Neoplasias. *Int J Gynecol Pathol*. 2020 Jul;39(4):384-390. doi: 10.1097/PGP.0000000000000617. PMID: 32515923.
24. Stoler MH, Wright Jr. TC., Ferenczy A, Ranger-Moore J, Fang Q, Kapadia M, Ridder R. Use of Adjunctive p16 Immunohistochemistry Improves Diagnostic Agreement of Cervical Biopsy Interpretation, *The American Journal of Surgical Pathology*: August 2018. 429(8):1001-1009 doi: 10.1097/PAS.0000000000001072
25. Lukic A, Rossi S, Frega A, Ruscito I, Bianchi P, Nobili F, Caserta D, Vecchione A. Prognostic role of immunohistochemical overexpression of the p16 protein in women under the age of 35 and diagnosed with HSIL (CIN2) subjected to "cervix sparing" excision. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 Feb;25(3):1261-1273. doi: 10.26355/eurrev_202102_24830. PMID: 33629296.

Figure 1- Participant selection flowchart. Caption: n – absolute frequency

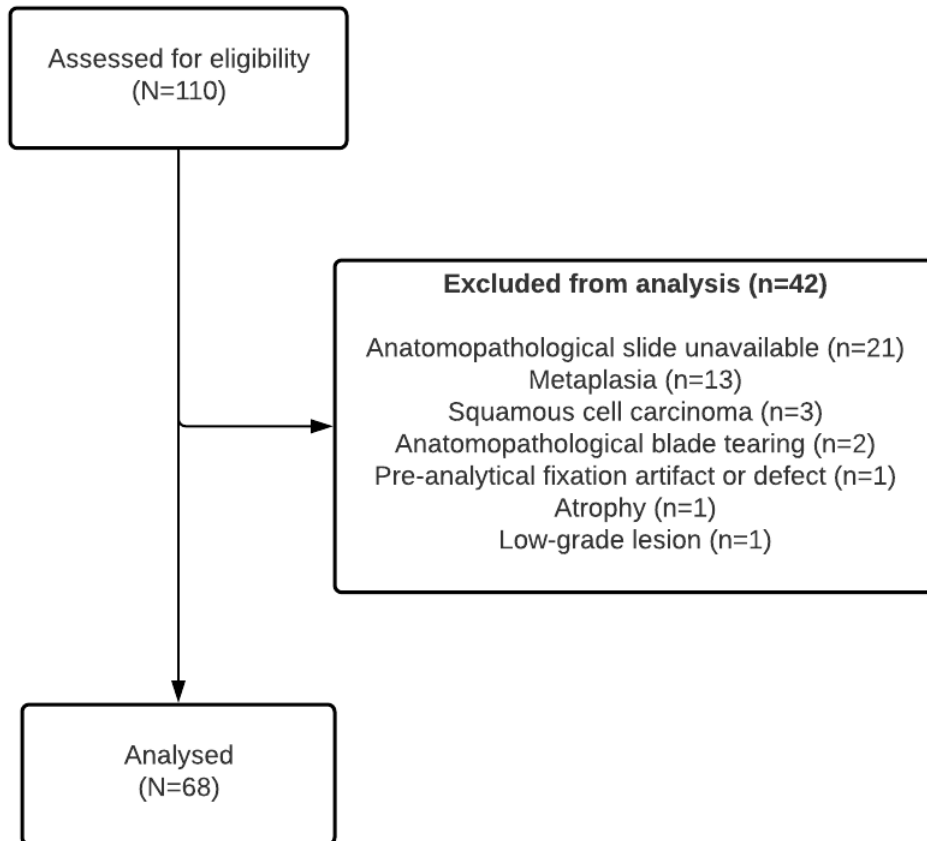


Table 1 – Sociodemographic characterization of the analyzed patients

Variable	Total (N=68)
Age at diagnosis (in years) – md (IQR) (Minimum – Maximum)	27.0 (24.0 – 29.0) (18.0 – 30.0)
Schooling – n (%)	
Incomplete Elementary School	24 (35.3)
Complete Elementary School	9 (13.2)
Incomplete High School	9 (13.2)
Complete High School	21 (30.9)
High Education	5 (7.4)
Parity – n (%)	
Nulliparous	15 (22.1)
Primipara	27 (39.7)
Multipara	24 (35.3)
INO	2 (2.9)
Smoking – n (%)	
No	47 (69.1)
Yes	19 (27.9)
INO	3 (2.9)
Comorbidities – n (%)	
No	49 (72.1)
HIV/AIDS	10 (14.7)
Hepatitis C	3 (4.4)
Systemic arterial hypertension	2 (2.9)
Diabetes <i>mellitus</i>	1 (1.5)
Epilepsy	2 (2.9)
Crohn's disease	1 (1.5)
INO	2 (2.9)
Immunosuppression– n (%)	
No	55 (80.9)
Yes	11 (16.2)
INO	2 (2.9)

Legend: md – median. IQR – interquartile range (25th – 75th percentiles). n – absolute frequency. n% – relative frequency. INO – information not obtained. HIV – human immunodeficiency virus. AIDS – acquired immunodeficiency syndrome.

Table 2 – Pathological changes and outcomes.

Variable	Total (N=68)
Anatomopathological – n (%)	
NIC II	15 (22.1)
NIC III	53 (77.9)
P16 ^{INK4a} – n (%)	
Negative	2 (2.9)
Positive	66 (97.1)
Ki67 – n (%)	
Negative	1 (1.5)
Positive	67 (98.5)
Clinical outcome – n (%)	
Outpatient discharge	65 (95.6)
INO	3 (4.4)

Legend: n – absolute frequency. n% – relative frequency. CIN – cervical intraepithelial neoplasia. NSA – not applicable. INO – information not obtained. P16INK4a and Ki67 – immunohistochemical markers.

Table 3 – Correlations between variables of interest

Variable	Ki67 ⁺		P16 ⁺	
	P	p-value	P	p-value
Ki67 ⁺	1.000	-	0.702	≤0.001
P16 ⁺	0.702	≤0.001	1.000	-
Age	0.207	0.090	0.018	0.885
Age ≤25 years	0.165	0.178	0.054	0.664
Parity	0.178	0.153	0.178	0.153
Smoking	0.081	0.510	0.081	0.510
Immunosuppression	0.055	0.658	0.055	0.658

Legenda: ρ – Spearman correlation coefficient. p – index of statistical significance.

P16INK4a and Ki67 – immuno histochemical markers.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A imuno-histoquímica vem sendo muito utilizada para melhor reprodutibilidade diagnóstica sobre as displasias intraepiteliais cervicais, principalmente quando há dúvidas na sua classificação e nas alterações que possam mimetizar lesões, bem como quando há discordância entre patologistas em relação ao diagnóstico.

Nesta pesquisa, não se comprovou benefício com o uso desta técnica e, até o momento, o seu uso rotineiro não está justificado, pois tal conduta acarreta mais gastos com Saúde Pública, sem trazer uma real vantagem para o tratamento e seguimento de nossas pacientes.

PERSPECTIVAS

Os marcadores são muito importantes para melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade do diagnóstico das neoplasias intraepiteliais cervicais e, com isto, evitar procedimentos cirúrgicos desnecessários principalmente em pacientes jovens.

Salienta-se ainda que devem ser realizados outros estudos com um maior número de pacientes, a fim de compreender melhor o papel dos marcadores em foco.

ANEXO I – Instrumento de coleta de dados**1. IDENTIFICAÇÃO**

Número identificador:

Data de nascimento:

Prontuário:

Data da primeira consulta:

2. ACHADOS CITO/HISTOPATOLÓGICOS

Resultado anatomopatológico:

Data diagnóstico:

Procedimento diagnóstico:

3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Idade no diagnóstico:

Paridade:

Imunossupressão: () NÃO () SIM - Qual:

Tabagismo: () NÃO () SIM

Observações:

4. TRATAMENTO

Procedimento cirúrgico: () NÃO () SIM

Tratamento não cirúrgico: () NÃO () SIM - Qual (is):

5. IMUNOISTOQUÍMICA

Imunomarcção de P16: () NÃO () SIM

Imunomarcção de ki-67: () NÃO () SIM

6. SEGUIMENTO

Normal / Alta : () NÃO () SIM

Recidiva durante o seguimento: () NÃO () SIM