

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

TESE DE DOUTORADO

**CONTRIBUIÇÃO DE CARACTERÍSTICAS  
MORFOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS  
PARA O DIAGNÓSTICO DE LESÕES  
SERRILHADAS COLORRETAIS.**

CESAR DE SOUZA BASTOS JUNIOR

ORIENTADORAS:

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup>. VERA LUCIA NUNES PANNAIN

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ADRIANA CAROLI-BOTTINO

DEZEMBRO 2021

CONTRIBUIÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E IMUNO-  
HISTOQUÍMICAS PARA O DIAGNÓSTICO DE LESÕES SERRILHADAS  
COLORRETAIS.

Cesar de Souza Bastos Junior

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Anatomia  
Patológica, Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como requisito parcial à obtenção do título  
de Doutor em Anatomia Patológica

Orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Vera Lucia Nunes Pannain  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Adriana M. Caroli de Freitas Bottino

RIO DE JANEIRO

**2021**

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro  
© reprodução autorizada pelo autor

dB327c de Souza Bastos Junior, Cesar  
Contribuição de características morfológicas e  
imuno-histoquímicas para o diagnóstico de lesões  
serrilhadas do intestino grosso / Cesar de Souza  
Bastos Junior. -- Rio de Janeiro, 2021.  
142 f.

Orientador: Vera Lúcia Nunes Pannain.  
Coorientador: Adriana Marques Caroli de Freitas  
Bottino.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós  
Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), 2021.

1. Lesão serrilhada. 2. Pólipo colorretal. 3.  
Adenoma serrilhado. I. Lúcia Nunes Pannain, Vera,  
orient. II. Marques Caroli de Freitas Bottino,  
Adriana, coorient. III. Título.

CONTRIBUIÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E IMUNO-  
HISTOQUÍMICAS PARA O DIAGNÓSTICO DE LESÕES SERRILHADAS  
COLORRETAIS.

Cesar de Souza Bastos Junior

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Anatomia  
Patológica, Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como requisito parcial à obtenção do título  
de Doutor em Anatomia Patológica

Aprovada por:



-----  
Presidente, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Lúcia Nunes Pannain  
Universidade Federal do Rio de Janeiro



-----  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Cristiane Bedran Milito  
Universidade Federal do Rio de Janeiro



-----  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Ivanir Martins de Oliveira  
Instituto Nacional do Câncer



-----  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Vera Lucia Antunes Chagas  
Universidade Federal do Rio de Janeiro



-----  
Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

*À saudosa amiga Ana Patrícia Cabral de Lima,  
Minha inspiração na docência e  
Minha amiga de todas as horas;  
Nossos sonhos foram apenas adiados.*

## AGRADECIMENTOS

Às Prof<sup>as</sup> Vera Lúcia Nunes Pannain e Adriana Caroli-Bottino pela orientação ao longo destes quase quatro anos e pela confiança no meu trabalho, em momentos em que eu mesmo duvidei. Encerra-se hoje um ciclo que começou em 2007, primeira vez que iniciei um estágio naquela Instituição que por várias vezes havia passeado nos meus sonhos. Em muitos momentos, antes mesmo do Doutorado, os professores do Departamento de Patologia da UFRJ sempre me inspiraram e foram motivo de orgulho.

Às Prof<sup>as</sup> Nathalie Canedo e Adriane Reis Todeschini, e tantos outros professores da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelos apoios prestados durante a elaboração deste estudo.

Ao Professor Ronir Raggio, por ter se disponibilizado a me orientar na estatística do trabalho, com paciência e muita didática.

À técnica de laboratório de imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da UFRJ, Arlete Fernandes, por sua dedicação inabalável, mesmo em meio ao conturbado ano de 2020. Não há palavras que possam expressar minha gratidão pelo seu prestimoso trabalho.

À Alta Administração Naval, aos antigos e atuais Diretores de toda a cadeia hierárquica que autorizaram e permitiram a realização de tão significativo passo em minha formação, cujos conhecimentos adquiridos irei disseminar dentro da Força.

Aos amigos que deixei no Serviço de Patologia do Hospital Naval Marcílio Dias, todos, sem exceção, que sempre trabalharam ao meu lado e me apoiaram ao longo de toda a jornada.

Aos Oficiais e Praças do Gabinete da Direção da Policlínica Naval de Campo Grande, extensiva à toda sua tripulação. A condução segura de nossa Organização pelos militares deste Gabinete, permitiram que eu pudesse me concentrar, nos momentos necessários, neste estudo realizado.

Aos amigos Ana Lúcia e Edmar Arêas, Vera Lobo, Elizabeth Schaeffer, Rita de Cássia Arruda, Verônica Ramalho, Daniel Obadia, Gustavo Duarte, Leandro Sousa, Maki Sago, Paulo H. Carmo, Patrícia Ocampo, Monique França, Fernando Belles, Ana Carolina Britto, Verônica Goulart, Jaqueline Pinho, Tatiana Fonseca e Roberta Acar, pela fiel amizade e parceria ao longo de todos estes anos.

Aos meus familiares, mãe, tias, prima e irmãos, obrigado pela compreensão de minhas ausências e pelas provas constantes de carinho e amor.

À Organização Brasil Soka Gakkai Internacional (BSGI) por tudo o que significa em meu crescimento e minha Revolução Humana.

À minha querida amiga Ana Patrícia Cabral de Lima (*in memoriam*). A ideia era chegarmos aqui juntos, mas nessa vida só temos o presente. Gratidão por ter vivido muitos “presentes” com você. Chegamos aqui juntos, ainda que distantes.

**“Não se anda porque existe um caminho, é por andar que o caminho se abre”**

*Daisaku Ikeda*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido Acetil Salicílico
AC	Adenoma Convencional
ANXA10	Anexina A10
APC	<i>Adenomatous Poliposi Coli</i>
ASS	Adenoma Serrilhado Séssil
AST	Adenoma Serrilhado Tradicional
AT	Adenoma Tubular
ATV	Adenoma Túbulo-Viloso
BAX	<i>BCL-2 Associated X Protein Gene</i>
BRAF	<i>B-raf proto-oncogen, serine/threonine kinase</i>
CCNPH	Carcinoma colorretal não-polipose hereditário
CCR	Carcinomas colorretais
CDX2	<i>Caudal Type Homeobox 2 Gen</i>
CIMP	<i>Cytosine-phosphoguanine Island Methylator Phenotype</i>
CIMP-H	<i>High Level CIMP</i>
CIMP-L	<i>Low Level CIMP</i>
CpG	<i>Cytosine Guanine Islands</i>
DAB	Diaminobenzidina
DCC	<i>DCC Netrin 1 Receptor</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
FABP6	<i>Fatty Acid Binding Protein 6</i>
GSK3B	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta Gene</i>
IC	Instabilidade Cromossômica
IGFBP7	<i>Insulin Like Growth Factor Binding Protein 7 Gene</i>
IMC	Índice de Massa Corpórea
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
Ki-67	<i>Marker of proliferation Ki-67</i>
LOH	<i>Loss of Heterozigosity</i>
LSS	Lesões Serrilhadas Sésseis
LSS-CD	Lesões Serrilhadas Sésseis com Displasia
MAP	<i>MUTYH (MutY Homolog) Gene Associated Polyposis</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCC	<i>Mutated In Colorectal Cancers Gene</i>

<i>MGMT</i>	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
<i>MEK1</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
<i>MEK2</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>
<i>MINT 1</i>	<i>Methylated in Tumor 1</i>
<i>MINT 2</i>	<i>Methylated in Tumor 2</i>
<i>MINT 31</i>	<i>Methylated in Tumor 31</i>
<i>MLH1</i>	<i>MutL Homolog 1</i>
<i>MMR</i>	<i>Mismatch Repair Gens</i>
<i>MSH2</i>	<i>MutS homolog 2</i>
<i>MSH6</i>	<i>MutS homolog 6</i>
<i>MSI</i>	<i>Microsatellite Instable</i>
<i>MSS</i>	<i>Microsatellite Stable</i>
<i>MS-PCR</i>	<i>Methylation-Specific Protein Chain Reaction</i>
<i>MSI-H</i>	<i>Microsatelite Instable – High Level</i>
<i>MSI-L</i>	<i>Microsatelite Instable – Low Level</i>
<i>MUC 1</i>	<i>Mucin 1 Gene</i>
<i>MUC 6</i>	<i>Mucin 6 Gene</i>
<i>MUC5AC</i>	<i>Mucin 5AC Gene</i>
<i>MUTYH</i>	<i>MutY Human DNA Glycosylase</i>
<i>MYC</i>	<i>Myelocytomatosis (Avian Virus Gene)</i>
<i>OL</i>	<i>Outras Lesões</i>
<i>OMS</i>	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
<i>OR</i>	<i>Odds Ratio</i>
<i>NRAS</i>	<i>Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homolog</i>
<i>PAF</i>	<i>Polipose Adenomatosa Familiar</i>
<i>PCR</i>	<i>Protein Chain Reaction</i>
<i>PH</i>	<i>Pólipo Hiperplásico</i>
<i>PHRCC</i>	<i>Pólipo Hiperplásico Rico em Células Caliciformes</i>
<i>PHMV</i>	<i>Pólipo Hiperplásico Microvesicular</i>
<i>PHPM</i>	<i>Pólipo Hiperplásico Pobre em Mucina</i>
<i>PI</i>	<i>Pólipo Inflamatório</i>
<i>PM</i>	<i>Pólipo Misto</i>
<i>PMS2</i>	<i>Postmeiotic segregation increased 2</i>
<i>ROC</i>	<i>Receiver Operating Characteristic (Curve)</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Real Time Protein Chain Reaction</i>

<i>SFRP</i>	<i>Secreted Frizzled-Related Protein</i>
<i>SMAD</i>	<i>SMAD Family Member (SMAD2, SMAD3, SMAD4)</i>
<i>SPS</i>	<i>Síndrome de Polipose Serrilhada</i>
<i>SSA</i>	<i>Sessile Serrated Adenoma</i>
<i>SSA/P</i>	<i>Sessile Serrated Adenoma/Polyps</i>
<i>TCF-LEF</i>	<i>T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
<i>TFF2</i>	<i>Trefoil Factor 2</i>
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
<i>TGI</i>	<i>Trato Gastrointestinal</i>
<i>TMA</i>	<i>Tissue Micro Array</i>
<i>WNT</i>	<i>(via ) Wingless</i>

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Resumo das Classificações Endoscópicas de Paris e Kudo.	pg 55
Quadro 2	Evolução na classificação dos pólipos serrilhados.	pg 56
Quadro 3	Tipos de lesões serrilhadas e suas características histológicas.	pg 57
Quadro 4	Níveis de concordância interobservador em diferentes estudos.	pg 64
Quadro 5	Características morfológicas em relação aos diagnósticos.	pg 69
Quadro 6	Anticorpos primários utilizados.	pg 72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos casos por diagnóstico principal.	pg 79
Tabela 2	Correlação entre a média e mediana das idades observadas (variável contínua) e os diagnósticos.	pg 83
Tabela 3	Correlação entre variáveis clínico-epidemiológicas e diagnóstico.	pg 84
Tabela 4	Distribuição das variáveis morfológicas na amostra.	pg 86
Tabela 5	Correlação entre variáveis clínico-epidemiológicas usuais em pólipos hiperplásicos e lesões serrilhadas sésses (grupo I) e diagnóstico.	pg 92
Tabela 6	Correlação entre variáveis clínico-epidemiológicas usuais em adenomas convencionais (grupo II) e diagnóstico.	pg 94
Tabela 7	Correlação entre variáveis clínico-epidemiológicas usuais em adenomas serrilhados tradicionais (grupo III) e diagnóstico.	pg 95
Tabela 8	Distribuição das variáveis imuno-histoquímicas na amostra.	pg 100
Tabela 9	Correlação entre a expressão de BRAF e Anexina A10 e os diagnósticos.	pg 101
Tabela 10	Correlação entre a expressão de BRAF e Anexina A10 entre os pólipos serrilhados.	pg 102
Tabela 11	Correlação entre a expressão de Ki-67 e MUC-1 com diagnósticos e MLH-1, com diagnósticos e displasia.	pg 103
Tabela 12	Modelo de regressão logística baseado nas variáveis adequadas.	pg 105
Tabela 13	Aplicação do teste de <i>Hosmer-Lemeshow</i> para avaliação do modelo de regressão logística.	pg 106
Tabela 14	Distribuição dos pólipos serrilhados de acordo com a pontuação do escore.	pg 106
Tabela 15	Valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos para o diagnóstico de LSS com uso do escore proposto.	pg 108

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resumo das correlações entre as alterações moleculares.	pg 28
Figura 2	Lesão Serrilhada Séssil. Adenoma serrilhado tradicional.	pg 56
Figura 3	Adenoma convencional.	pg 80
Figura 4	Pólipo hiperplásico microvesicular.	pg 80
Figura 5	Pólipo hiperplásico rico em células caliciformes.	pg 81
Figura 6	Lesão Serrilhada Séssil	pg 81
Figura 7	Lesão Serrilhada Séssil com Displasia Serrilhada	pg 82
Figura 8	Adenoma serrilhado tradicional.	pg 82
Figura 9	Serrilhamento luminal	pg 85
Figura 10	Irregularidade de criptas.	pg 85
Figura 11	Dilatação da base da cripta.	pg 87
Figura 12	Prolongamento Horizontal.	pg 87
Figura 13	Herniação submucosa	pg 88
Figura 14	Serrilhamento luminal, células microvesiculares	pg 88
Figura 15	Arquitetura vilosa	pg 89
Figura 16	“Crowding”. Sobreposição nuclear.	pg 89
Figura 17	Núcleos “pencilados”. Criptas ectópicas.	pg 90
Figura 18	Displasia convencional.	pg 91
Figura 19	Displasia serrilhada.	pg 91
Figura 20	Padrões de expressão do marcador BRAF. Positividade citoplasmática fraca.	pg 96
Figura 21	Padrões de expressão do marcador BRAF. Positividade citoplasmática forte.	pg 96
Figura 22	Padrões de expressão do marcador Anexina A10. Positividade em cerca de 6 a 50% das glândulas	pg 97
Figura 23	Padrões de expressão do marcador Anexina A10. Positividade acima de 50% das glândulas	pg 97
Figura 24	Padrões de expressão do Ki-67. Positividade restrita à porção basal das criptas.	pg 98
Figura 25	Padrões de expressão do Ki-67. Positividade restrita à porção basal das criptas.	pg 98
Figura 26	Padrões de expressão do Ki-67. Positividade difusa.	pg 99
Figura 27	Padrões de expressão do Ki-67. Positividade focal e esparsa, sobretudo em criptas ectópicas.	pg 99
Figura 28	Análises da Curva ROC para cálculo de sensibilidade e especificidade.	pg 107

## RESUMO

**BASTOS JUNIOR**, Cesar de Souza. Contribuição de características morfológicas e imuno-histoquímicas para o diagnóstico de lesões serrilhadas colorretais. Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Medicina- Anatomia Patológica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

**INTRODUÇÃO:** Nos últimos 30 anos houve grande evolução no conhecimento das lesões serrilhadas colorretais e sua relação com vias moleculares recentemente descritas. Apesar de recente atualização dos critérios morfológicos e mudanças de nomenclatura, o diagnóstico das lesões serrilhadas sésseis (LSS) ainda permanece um desafio diagnóstico, justificando a investigação de métodos adicionais que possam contribuir na sua utilização. **OBJETIVOS:** Aplicar a classificação da OMS de 2019 a uma amostra de lesões serrilhadas colorretais com base em suas características diagnósticas, morfológicas e imuno-histoquímicas; correlacionar as características morfológicas e os padrões da expressão dos anticorpos ANXA10, MUC1, BRAF, MLH1 e Ki-67, com os diagnósticos das lesões serrilhadas colorretais da amostra; propor a utilização de um escore para o diagnóstico de lesões serrilhadas sésseis; e comparar os adenomas convencionais com as lesões serrilhadas em relação às características diagnósticas, clínico-epidemiológicas, morfológicas e imuno-histoquímicas. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram analisados 172 pólipos colorretais (serrilhados e convencionais) e verificadas características morfológicas de acordo com a nova classificação da OMS e expressão imuno-histoquímica de BRAF, ANXA10, MLH1, MUC1 e Ki-67. **RESULTADOS:** Foram identificados 108 pólipos serrilhados e 64 adenomas convencionais (AC). A maior parte dos pólipos serrilhados ocorreu em pacientes entre 50 e 70 anos ( $p = 0,016$ ) e 50% das LSS foi identificada em cólon direito ( $p < 0,0001$ ). Em relação às alterações morfológicas a presença de dilatação da base, irregularidade de criptas e serrilhamento luminal distal foram as características mais frequentes em LSS. Eosinofilia citoplasmática, núcleos alongados ou “*penciloides*” e criptas ectópicas foram as principais características de adenomas serrilhados tradicionais. Expressão de BRAF foi observada em cerca de 57,1% dos pólipos hiperplásicos (PH) e 79,2% das LSS, 54,8% dos PH e 89,6% das LSS mostrou positividade para ANXA10 e nenhuma expressão foi observada em AC ( $p < 0,0001$ ). Localização em cólon direito, expressão de BRAF e ANXA10 mostraram aumento de chances de diagnóstico de LSS (OR: 9,6; OR: 5,0 e OR: 24,2 -  $p = 0,0005$ , 0,006 e 0,0002), o que permitiu a elaboração de escore com valores de 0 a 9 e, sensibilidade e especificidade, de 66,67% e 83,33%, quando considerado 4 como ponto de corte. **CONCLUSÃO:** O serrilhamento luminal distal e a irregularidade de 03 ou mais criptas, foram as características mais frequentes em LSS. A maioria dos PH mostrou serrilhamento em terço proximal, sem irregularidade de criptas. Expressão de BRAF foi mais frequente em PH e LSS e, a maioria das LSS exibiu expressão de ANXA10, acima de 50%. A utilização de BRAF e ANXA10, junto com a localização da lesão pode constituir ferramenta adicional para o diagnóstico de lesões serrilhadas.

Palavras-Chave: Lesões serrilhadas, adenomas convencionais, intestino grosso, morfologia, imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

**BASTOS JUNIOR**, Cesar de Souza. Contribuição de características morfológicas e imuno-histoquímicas para o diagnóstico de lesões serrilhadas colorretais. Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Medicina- Anatomia Patológica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

**INTRODUCTION:** In the past 30 years, there has been an increase in knowledge of serrated lesions of colorectum and their relationship with recently described molecular pathways. Despite the recent update of morphological criteria and nomenclature changes, the diagnosis of serrated lesions remains a challenge, what justifies the investigation of additional tools that can contribute to the diagnostic.

**OBJECTIVES:** To apply the 2019 WHO classification to a sample of colorectal serrated lesions based on diagnostic, morphological and immunohistochemical characteristics; correlate morphological characteristics and patterns of expression of ANXA10, MUC1, BRAF, MLH1 and Ki-67, with the diagnoses of colorectal serrated lesions in the sample; to propose the use of a score to be applied to the diagnostic of sessile serrated lesions; and to compare conventional adenomas with serrated lesions in relation to diagnostic, clinical-epidemiological, morphological and immunohistochemical characteristics.

**MATERIAL AND METHODS:** 172 colorectal polyps (serrated and conventional) were analyzed, and morphological characteristics were verified according to the new WHO classification and immunohistochemical expression of BRAF, ANXA10, MLH1, MUC1 and Ki-67.

**RESULTS:** It were identified 108 serrated polyps and 64 conventional adenomas (CA). Most of the serrated polyps occurred in patients between 50 and 70 years ( $p = 0.016$ ) and 50% of the sessile serrated lesions (SSL) was identified in the right colon ( $p < 0.0001$ ). Regarding morphological alterations, the presence of base crypt dilation, crypt irregularity and distal luminal serration were the most frequent characteristics in SSL. Cytoplasmic eosinophilia, pencilated nuclei and ectopic crypts were the main characteristics of traditional serrated adenomas. BRAF expression was observed in about 57.1% of hyperplastic polyps (HP) and 79.2% of SSL, 54.8% of HP and 89.6% of SSL showed positivity for ANXA10 and no expression was observed in CA ( $p < 0.0001$ ). Localization in the right colon, BRAF and ANXA10 expression showed increased chances of the diagnostic of a SSL (OR: 9.6; OR: 5.0 and OR: 24.2 -  $p = 0.0005$ , 0.006 and 0.0002), which allowed the elaboration of a score with values from 0 to 9 and sensitivity and specificity of 66.67% and 83.33%, when considered 4 as a cutoff point.

**CONCLUSION:** Distal luminal serration and irregularity of 03 or more crypts were the most frequent characteristics in SSL. The majority of PH showed serration in the proximal third, without crypt irregularity. BRAF expression was more frequent in HP and SSL and most SSL exhibited ANXA10 expression above 50%. The use of BRAF and ANXA10, together with the location of the lesion, may be an additional tool for the diagnosis of serrated lesions.

Keywords: Serrated lesions, conventional adenomas, large intestine, morphology, immunohistochemistry.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	pg 18
2	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	pg 22
2.1	VIAS MOLECULARES DA CARCINOGENESE COLORRETAL	pg 22
2.1.1	<b>Via da sequência clássica adenoma-adenocarcinoma</b>	pg 22
2.1.2	<b>Via do emparelhamento errôneo – instabilidade microssatélite</b>	pg 24
2.1.3	<b>Via serrilhada</b>	pg 27
2.1.4	<b>Papel dos biomarcadores na via serrilhada de carcinogênese colorretal</b>	pg 37
2.1.4.1	BRAF	pg 37
2.1.4.2	Anexina A10	pg 39
2.1.4.3	Ki-67	pg 40
2.1.4.4	MLH-1	pg 41
2.1.4.5	MUC-1	pg 42
2.2	LESÕES PRECURSORAS	pg 43
2.2.1	<b>Adenomas Convencionais</b>	pg 43
2.2.2	<b>Classificação e Características Morfológicas das Lesões Serrilhadas</b>	pg 44
2.2.2.1	pólipos hiperplásicos	pg 44
2.2.2.2	lesões serrilhadas sésseis	pg 46
2.2.2.3	adenoma serrilhado tradicional	pg 52
2.2.2.4	pólipos serrilhados não classificados	pg 54
2.2.3	<b>Características Colonoscópicas Observadas em Lesões Serrilhadas Colorretais.</b>	pg 54
2.3	A EVOLUÇÃO DAS CLASSIFICAÇÕES DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE	pg 56
2.4	REPRODUTIBILIDADE DOS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS E CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADOR	pg 58
3	<b>OBJETIVOS</b>	pg 65
3.1	OBJETIVO GERAL	pg 65
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	pg 65
4	MATERIAL E MÉTODOS	pg 66

4.1	SELEÇÃO DA AMOSTRA	pg 66
4.2	CRITÉRIO DE INCLUSÃO	pg 68
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	pg 68
4.4	VARIÁVEIS DIAGNÓSTICAS E CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS	pg 68
4.5	ESTUDO MORFOLÓGICO	pg 68
4.6	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	pg 72
4.6.1	<b>Técnica Imuno-histoquímica.</b>	pg 73
4.6.2	<b>Padrões de imunomarcação.</b>	pg 75
4.6.2.1	BRAF	pg 75
4.6.2.2	Anexina A10	pg 75
4.6.2.3	Ki-67	pg 76
4.6.2.4	MLH-1	pg 76
4.6.2.5	MUC-1	pg 77
4.7	ORGANIZAÇÃO DOS DADOS	pg 77
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	pg 77
4.9	ASPECTOS ÉTICOS	pg 78
5	<b>RESULTADOS</b>	Pg 79
5.1	FREQUÊNCIA DAS VARIÁVEIS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS.	pg 79
5.1.1	<b>Distribuição dos casos por diagnóstico</b>	pg 79
5.1.2	<b>Distribuição dos casos por idade, sexo e topografia e a correlação com os diagnósticos da amostra.</b>	pg 83
5.2	FREQUÊNCIA E CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS MORFOLÓGICAS.	pg 84
5.2.1	<b>Variáveis citológicas e arquiteturais e correlação com o diagnóstico.</b>	pg 84
5.2.2.1	grupo I. Variáveis morfológicas mais relacionadas às lesões serrilhadas sésseis e pólipos hiperplásicos.	pg 92
5.2.2.2	grupo II. Variáveis morfológicas mais comumente observadas nos adenomas convencionais.	pg 94
5.2.2.3	grupo III. Variáveis morfológicas próprias de adenomas serrilhados tradicionais.	pg 94
5.3	FREQUÊNCIA E CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS IMUNO-HISTOQUÍMICAS COM O DIAGNÓSTICO	pg 95

5.3.1	<b>Frequência e Correlação das Variáveis Imuno-histoquímicas.</b>	pg 95
5.3.2	<b>Correlação das Variáveis Imuno-histoquímicas com o Diagnóstico.</b>	pg 100
5.3.2.1	BRAF e Anexina A10.	pg 100
5.3.2.2	Ki-67, MUC-1 e MLH-1.	pg 103
5.4	<b>REGRESSÃO LOGÍSTICA E ELABORAÇÃO DE ESCORE DIAGNÓSTICO.</b>	pg 104
5.4.1	<b>Regressão Logística Binária e Escore Diagnóstico.</b>	pg 105
5.4.2	<b>Avaliação do Ponto de Corte e Acurácia do Escore Simplificado.</b>	pg 106
6	<b>DISCUSSÃO</b>	pg 109
7	<b>CONCLUSÕES</b>	pg 128
8	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	pg 130
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	pg 132
	<b>ANEXO A - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA</b>	pg 141
	<b>ANEXO B - PUBLICAÇÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO</b>	pg 142

## 1. INTRODUÇÃO

Os carcinomas colorretais (CCR) são a neoplasia maligna gastrointestinal mais comum no mundo, com cerca de 150.000 novos casos por ano nos Estados Unidos, correspondendo a cerca de 52.000 mortes anualmente e representando aproximadamente 15% de todas as mortes relacionadas ao câncer <sup>(1)</sup>. No Brasil, estimam-se 40.990 novos casos anualmente, sendo 20.520 homens e 20.470 mulheres e correspondendo, a cerca de 20.578 mortes por ano, das quais 10.191 na população masculina e 10.385 entre as mulheres <sup>(2)</sup>.

O pico de incidência desta lesão encontra-se entre as idades de 60 e 70 anos, com apenas 20% destes ocorrendo abaixo de 50 anos. Fatores de risco relacionados a esta condição incluem dieta rica em gordura animal, estilo de vida sedentário e a coexistência de doença intestinal inflamatória, dentre outros <sup>(1)</sup>.

O surgimento dos CCR encontra-se relacionado à combinação de uma série de eventos moleculares que incluem anormalidades genéticas e epigenéticas. Tradicionalmente descreviam-se pelo menos duas vias genéticas distintas; a primeira delas a via APC/ beta-catenina, associada à ativação da via *Wingless* (WNT) e da clássica sequência adenoma-adenocarcinoma e, no outro extremo, a via da instabilidade microssatélite (MSI), associada a defeitos nos genes do emparelhamento errôneo (*mismatch repair gens*, MMR). Ambas as vias envolvem o acúmulo sequencial de múltiplas mutações. Os genes e os mecanismos pelos quais as mutações ocorrem são diferentes entre si; além disso, eventos epigenéticos contribuem para a progressão tumoral em ambas as vias, sendo o mais comum o silenciamento de genes induzidos por metilação <sup>(1)</sup>.

Até recentemente a classificação das lesões precursoras dos CCR se

limitava ao diagnóstico de adenomas e, outros tipos de pólipos como os pólipos hiperplásicos eram considerados desprovidos de risco de malignidade. No início dos anos 90 foram descritas lesões com características morfológicas e moleculares intermediárias entre as duas vias acima descritas, até então protótipos dos modelos de carcinogênese <sup>(1)</sup>. Em 1990 foi descrita por *Longacre-Fenoglio*, uma espécie de variante intermediária entre estas duas lesões anteriormente citadas (adenomas e pólipos hiperplásicos), inicialmente chamada de “Pólipo misto hiperplásico-adenomatoso / Adenoma Serrilhado”, com características semelhantes aos pólipos hiperplásicos. Estas lesões, que apresentavam arquitetura serrilhada das luzes das glândulas, além de poderem exibir alterações displásicas, como as vistas em adenomas tradicionais, trouxeram a possibilidade da existência de um subgrupo de lesões adenomatosas, com potenciais distintos de comportamento e evolução <sup>(3)</sup>.

Nas últimas décadas, com o refinamento das técnicas moleculares e o avanço na compreensão das características morfológicas, imuno-histoquímicas e moleculares dos pólipos serrilhados, foi possível a classificação pela Organização Mundial de Saúde (OMS) destas lesões como pólipos hiperplásicos (lesões caracterizadas pela presença de serrilhamento luminal de suas criptas restritas até seus dois terços proximais e, atualmente classificados como pólipos hiperplásicos microvesiculares – PHMV e ricos em células caliciformes - PHRCC), adenomas serrilhados sésseis com ou sem displasia (caracterizados pela presença de serrilhamento em toda a extensão da luz glandular, associado à dilatação de sua base e irregularidade arquitetural, atualmente denominadas de lesões serrilhadas sésseis), adenomas serrilhados tradicionais (pólipos de

padrão arquitetural viloso, com eosinofilia citoplasmática, núcleos alongados e formação de pequenas criptas não conectadas à membrana basal, denominadas criptas ectópicas) e pólipos mistos (lesões com características intermediárias entre os diagnósticos anteriores), utilizando-se critérios mais estruturados e menos subjetivos <sup>(4)</sup>. Além disso, teve início a caracterização de uma via alternativa de carcinogênese para estas lesões, a chamada via serrilhada, com base em características moleculares e de comportamento próprias, com implicações no prognóstico e que demandam uma sistemática de vigilância específica. Alie-se a este fato, a crescente preocupação com a reprodutibilidade dos critérios utilizados para diagnóstico histopatológico destas lesões, bem como as estratégias de detecção e acompanhamento endoscópico <sup>(5)</sup>.

Muitas publicações vêm discutindo a adaptação por parte dos patologistas a estes novos conhecimentos, somado à importância de caracterização de um perfil molecular que possa contribuir para uma melhor padronização do diagnóstico destas lesões <sup>(5)</sup>. A multiplicidade de terminologias utilizadas nas últimas décadas, algumas vezes confusas, compromete não apenas a avaliação da reprodutibilidade diagnóstica, como a concordância interobservador. Muito embora as primeiras descrições dos pólipos serrilhados datem de 1990, ou seja, há 30 anos e, figurem nas três últimas publicações da OMS, os níveis descritos de discordância diagnóstica variam de 30 a 80%, conforme os principais estudos <sup>(6)</sup>. Este é um dado alarmante e reflete não apenas a necessidade de se investigar dentro de cada instituição os seus percentuais de concordância, bem como buscar formas de uniformizar critérios e reduzir sua subjetividade, objetivando melhor qualidade diagnóstica.

O reconhecimento do papel das lesões serrilhadas na carcinogênese colorretal e suas implicações no rastreamento, acompanhamento e tratamento destas lesões é uma realidade. Todavia, estes novos conhecimentos encontram-se limitados, dada a dificuldade atual em se definir e, de forma mais importante, reproduzir os principais critérios microscópicos de forma que isso represente uma melhora na concordância entre os médicos patologistas <sup>(5)</sup>.

Apesar de todo o avanço no conhecimento da biologia molecular e das vias de carcinogênese destas lesões, até hoje não existe um consenso sobre o uso de um ou mais marcadores (imuno-histoquímicos ou moleculares) que exerçam papel definidor no diagnóstico desta condição. Estudos com anticorpos não utilizados na rotina diária de imuno-histoquímica, como anti *B-raf proto-oncogen, serine/threonine kinase* (BRAF) e Anexina A10 (ANXA10), assim como métodos moleculares não frequentemente disponíveis na rotina diária (por exemplo, a pesquisa de metilação), têm sido fruto de investigação nos últimos anos e carecem de mais estudos <sup>(4)</sup>.

É fundamental também que se criem ferramentas diagnósticas que possam levar em consideração quais dos critérios já descritos apresentam melhor desempenho no diagnóstico, assim como maior capacidade de compreensão e reprodução por parte do patologista, de modo a exercer papel decisivo na conclusão diagnóstica. Torna-se importante, portanto, a contínua investigação das características morfológicas e moleculares das lesões desta via, o seu papel na progressão destas lesões neoplásicas, bem como avaliar a contribuição destes dados na melhoria da acurácia diagnóstica.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 VIAS MOLECULARES DA CARCINOGENESE COLORRETAL.

#### 2.1.1 Via da sequência clássica adenoma-adenocarcinoma

Esta é a via preferencial de surgimento dos carcinomas colorretais, correspondendo a cerca de 90% dos carcinomas desta localização, de uma maneira geral, e a cerca de 80% dos tumores de cólon esporádicos <sup>(1,4)</sup>.

O processo tem início com a mutação do gene *APC* (Polipose Adenomatosa Familiar - *Adenomatous Poliposis Coli*), um regulador do gene da beta-catenina, que por sua vez é um componente da via de sinalização WNT. Para que a *APC* perca a sua função, ambas as cópias deste gene precisam ser inativadas, seja por mutação ou por eventos epigenéticos. Os defeitos no gene *APC* podem ocorrer através da aquisição de mutações somáticas, como ocorrem nos cânceres esporádicos, ou mutações de linhagens germinativas herdadas, como na Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar, representando o “primeiro evento”, seguido da metilação dos alelos normais do gene, dando início à perda da função deste gene. O produto da transcrição deste gene, a proteína *APC*, normalmente se liga e promove a degradação da beta-catenina que, livre do estímulo supressor da proteína *APC* passa a se acumular no núcleo, onde ativa a transcrição de genes tais como *Myelocytomatosis Avian Virus Gene (MYC)* e *Ciclina D1*, responsáveis por promover a proliferação celular <sup>(1,4,7)</sup>.

Segue-se a este fenômeno, o acúmulo de mutações adicionais, incluindo as mutações ativadoras de proto-oncogenes, como o *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (KRAS)*, responsável pelo aumento da atividade proliferativa

e inibição da apoptose. A mutação do *KRAS* é considerada um fenômeno tardio, presente em apenas 10% dos adenomas menores que 1,0 cm, porém detectada em 50% dos adenomas acima deste tamanho e em 50% dos carcinomas invasivos. São também observadas mutações em genes supressores tumorais, como *SMAD Family Member* (*SMAD2* e *SMAD4*), efetores da via de sinalização do *Transforming Growth Factor Beta* (*TGF-β*), implicada na inibição do ciclo celular; a perda da função destes genes propicia o estímulo à atividade proliferativa celular <sup>(2,4)</sup>.

Outro gene supressor tumoral comumente implicado nesta via é o *p53*, apresentando mutação em 70 a 80% dos carcinomas colorretais, mas raro nos adenomas, sugerindo que tal mutação seja um fenômeno tardio no processo de carcinogênese. A perda de função deste e de outros genes supressores tumorais é normalmente causada por deleções com perda da heteroziguidade (LOH- *loss of heterozygosity*), ressaltando que a instabilidade cromossômica é a marca da via *APC/beta-catenina*. Esta mutação, quando geneticamente herdada, encontra-se implicada no surgimento da Síndrome de Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) em até 70% dos casos <sup>(2,4,8)</sup>.

De forma alternativa, são também observadas metilações em regiões conhecidas como *Cytosine Guanine Islands* - CpG (uma região 5' contendo uma sequência citosina-guanina de alguns genes e que inclui um local de promoção e início da transcrição). A metilação é a adição de um grupamento metila (CH<sub>3</sub>) ao nucleotídeo de citosina em um dinucleotídeo CG (citosina-guanina), ocorrendo na região promotora do gene como um mecanismo fisiológico, que regula a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA (*Desoxyribonucleic*

*Acid*), denominada alteração epigenética. Quando a metilação aberrante do DNA resulta em silenciamento da transcrição de genes supressores tumorais, pode ocorrer o estímulo ao crescimento neoplásico. Adicionalmente, cerca de 10% dos casos de Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) mostram-se relacionados a mutações no gene de reparo da *MutY Human DNA Glycosylase* (DNA MUTYH), relacionado à via do emparelhamento errôneo do DNA <sup>(4,9)</sup>.

### 2.1.2 Via do emparelhamento errôneo – instabilidade microssatélite

A perda da função de genes responsáveis pelo reparo do emparelhamento errôneo do DNA encontra-se implicada nesta via de carcinogênese colorretal. Os genes mais comumente afetados são *MLH1* (*mutL homolog 1*) e *MSH2*, (*mutS homolog 2*), além dos genes *MSH6* (*mutS homolog 6*), *PMS2* (*postmeiotic segregation increased 2*) e *PMS1* (*postmeiotic segregation increased 1*), que são responsáveis pela detecção, excisão e reparos do DNA durante a replicação <sup>(4,9)</sup>.

O protótipo desta via é a Síndrome de Lynch ou de Câncer Colorretal Não-Polipose Hereditário (CCNPH), descrita inicialmente em grupos familiares de ocorrência de câncer em diversas localizações como intestino grosso e delgado, endométrio, estômago, ovário, ureteres, cérebro, trato hepatobiliar e pele, sendo os tumores colorretais de ocorrência em faixas etárias mais jovens e frequentemente localizados no cólon ascendente <sup>(8)</sup>. Nesta condição, o paciente apresenta mutação herdada em um dos alelos dos genes do reparo do emparelhamento errôneo (MMR, do inglês *mismatch repair*), sendo o segundo alelo mutado ou epigeneticamente silenciado, levando ao acúmulo de mutações

em taxas até 1000 vezes acima do normal, principalmente em regiões contendo sequências repetidas de DNA referidas como “microsatélites” <sup>(9)</sup>.

O DNA humano possui cerca de 50.000 a 100.000 destas regiões de microsatélites, que são predispostas a se expandirem durante a replicação do DNA, representando o local mais frequente para a ocorrência de mutações no CCNPH <sup>(4,8)</sup>. Embora estas mutações sejam geralmente silenciosas devido à sua frequente ocorrência em regiões não-codificantes do DNA, alguns microsatélites se localizam em porções codificantes ou promotoras de genes envolvidos na regulação do crescimento celular, como os do receptor de *TGF- $\beta$*  tipo II e da proteína pro-apoptótica *BCL-2 Associated X Protein Gene (BAX)*, determinando crescimento celular descontrolado ou sobrevivência de clones celulares com graves anormalidades genéticas. Esta condição é conhecida como instabilidade microsatélite (*MSI- microsatellite instability*) e a ocorrência de carcinomas colorretais por esta via possui uma frequência de 15 a 30% <sup>(2,10)</sup>.

Mutações no oncogene *BRAF* e o silenciamento de diferentes grupos de genes devido à hipermetilação de regiões CpG também são comumente encontradas em cânceres que se desenvolvem através de um padrão de emparelhamento errôneo do DNA. Todavia, não necessariamente estas alterações encontram-se relacionadas à aquisição hereditária de mutação nos genes *MLH1*, *MSH2* e nos demais, conforme descrito na CCNPH. Em contraste, mutações do *KRAS* e *p53* não são detectadas nestes grupos de tumores, mostrando um perfil molecular característico de combinação de instabilidade microsatélite (*MSI*), mutação do *BRAF* e metilação de genes específicos como *MLH1*, *p16* e *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)* <sup>(9)</sup>.

Tais neoplasias até recentemente eram descritas dentro da via do emparelhamento errôneo; entretanto, com o avanço no conhecimento da biologia molecular destas lesões, foi possível identificar que as mesmas exibiam um perfil molecular específico e que, muito embora estivessem relacionadas à MSI, apresentavam uma espécie de assinatura genética própria e exibiam um fenótipo caracterizado morfológicamente pelo aspecto serrilhado de suas luzes, dentre outras características arquiteturais mais específicas <sup>(9,10)</sup>.

Além desse padrão, foi identificado ainda um grupo de tumores mostrando mutações do *KRAS*, associados à hipermetilação das regiões CpG (descritas como um fenótipo CIMP+, *CpG Island Methylator Phenotype*), porém sem instabilidade microssatélite; tais tumores não ou raramente apresentavam mutações no *BRAF* e *p53*. Por sua vez, tumores apresentando mutação no *p53*, são mais comumente encontrados na ausência de hipermetilação CpG (CIMP -) <sup>(10)</sup>.

Estas lesões, com perfis moleculares distintos dos protótipos descritos nas vias APC- beta-catenina e da Instabilidade Microssatélite, exibiam padrão morfológico com arquitetura sésil e serrilhamento de suas luzes glandulares. Tal padrão morfológico foi descrito primeiramente por *Longacre e Fenoglio* <sup>(3)</sup> em 1990 e aprimorado por *Torlakovic e Snover* <sup>(11)</sup> em 1996, e estas lesões, passaram a ser descritas como “Adenomas Serrilhados Sésseis” (*SSA Sessile Serrated Adenomas*). A multiplicidade de novas classificações destas lesões que surgiram posteriormente, associadas às novas informações a respeito do comportamento biológico e tratamentos, foram revistas ao longo das últimas décadas, passando a compor a Via Serrilhada de Carcinogênese <sup>(12)</sup>.

### 2.1.3 Via serrilhada.

Atualmente acredita-se que existam pelo menos cinco a seis vias moleculares que se sobrepõem para o surgimento dos CCR <sup>(13)</sup>, sendo que entre 70 a 80% destas lesões ocorram de forma esporádica e dentre as demais, encontram-se algumas que são geneticamente determinadas ou hereditárias <sup>(14)</sup>. Dentro do grupo de carcinomas colorretais com base genética ou hereditária, incluem-se a Síndrome de Lynch e a Polipose Adenomatosa Familiar e suas variantes, correspondendo a cerca de 3 e 1% cada, respectivamente. O grupo restante de casos, correspondendo a cerca de 16 %, compreende casos com uma certa tendência de agregação familiar e com características morfológicas e moleculares distintas <sup>(2,15)</sup>.

A visão mais recente das vias de desenvolvimento dos carcinomas colorretais (CCR) considera três mecanismos básicos para o surgimento destas lesões: a instabilidade cromossômica (IC), a hipermetilação de genes nas regiões CpG determinando um fenótipo específico (CIMP) e a instabilidade microsatélite (MSI), conforme anteriormente explicado. Hoje se considera que estas vias mais do que caminhos distintos, representem na realidade áreas de sobreposição, determinando assinaturas genéticas próprias para cada subtipo molecular de CCR <sup>(5,6)</sup>. A figura 1, abaixo, reúne a visão atual a respeito das vias de carcinogênese e os aspectos moleculares mais sedimentados, até então.

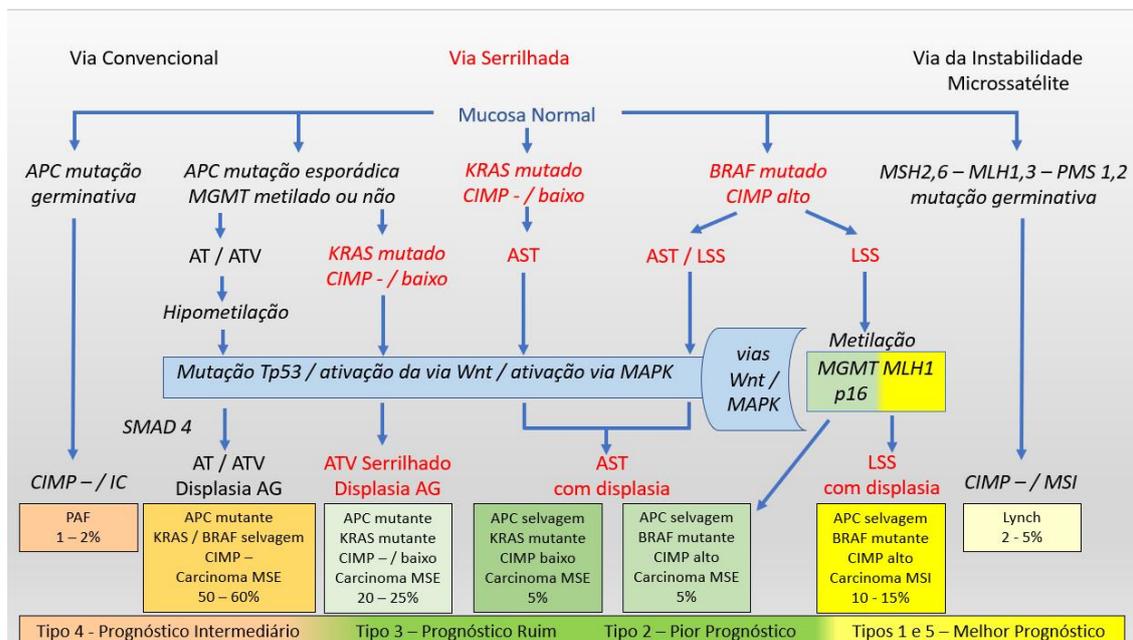


Figura 1: Resumo das correlações entre as alterações moleculares mais conhecidas, as vias de carcinogênese descritas, os tipos moleculares de CCR descritos e os tipos de lesões precursoras relacionadas. CIMP - :ausência de fenótipo CIMP; MSE: microssatélite estável; MSI: microssatélite instável; AT: adenoma tubular; ATV: adenoma túbulo-viloso; AST: adenoma serrilhado tradicional; LSS: lesão serrilhada sésil; IC: instabilidade cromossômica. Adaptado de East JE e cols, Kim JH e cols e Bettington M (5,43,74).

Acredita-se que até 85% dos CCR surjam através de instabilidade cromossômica. São tumores que mostram tipicamente aneuploidia do DNA, com anormalidades nos cromossomos 5, 17 e 18 e, mutações no gene da *APC*, no proto-oncogene *KRAS* e em genes supressores tumorais, como *p53* e *DCC*, conforme anteriormente demonstrado (16). Esta é a via mais comum para o surgimento de adenomas e CCR e, corresponde a então chamada via APC/beta-catenina, sendo responsável pela maioria dos CCR esporádicos e aqueles relacionados à PAF (5).

Aproximadamente 15% dos CCR parecem surgir através da mutação ou alteração epigenética (metilação) de importantes genes supressores tumorais ou relacionados com o reparo do DNA; estes cânceres tendem a apresentar DNA diploide e são associados à instabilidade microssatélite e/ou fenótipo de hipermetilação (17).

Conforme já abordado anteriormente, a MSI envolve a inativação de genes responsáveis pelo reparo do emparelhamento errôneo de genes durante a transcrição, levando principalmente à repetição de sequências de DNA não-codificante chamadas de microssatélites e que podem ocorrer de forma geneticamente herdada, como na Síndrome Lynch (CCNPH) ou através da metilação destes genes, principalmente *MLH1* e *MSH2*, em suas regiões promotoras <sup>(17)</sup>.

Sendo assim, em um extremo, correspondendo a uma frequência de até 3% dos CCR temos a MSI geneticamente herdada (CCNPH) e o restante (cerca de 12% dos CCR) correspondendo a uma rede de sobreposições de mecanismos moleculares que envolvem principalmente a mutação do gene *BRAF*, seguida da metilação de genes do emparelhamento errôneo (MMR), particularmente *MLH1*, levando a um padrão de instabilidade microssatélite chamado fenótipo MSI-H (*MSI high*) e/ou metilação de outros genes nas regiões CpG, levando ao chamado fenótipo conhecido como CIMP <sup>(17, 18)</sup>.

Protocolos para a pesquisa de MSI através da técnica do PCR (*Protein Chain Reaction*) recomendam o uso dos seguintes marcadores: BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 e D17S250; se 2 ou mais marcadores forem anormais, os CCR são considerados MSI-H (*MSI High*); se apenas um marcador for anormal, é chamado de MSI-L (*MSI low*), enquanto, se nenhum marcador se mostra alterado, os CCR são considerados MSI-estáveis ou MSS (*MSI stable*) <sup>(19)</sup>. Praticamente todos os cânceres MSI-H podem ser identificados com o uso de painel imuno-histoquímico utilizando-se os marcadores *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* e *MSH6* <sup>(17, 19)</sup>.

A identificação do fenótipo MSI-H entre os CCR é importante não apenas pela detecção precoce de pacientes portadores da Síndrome de Lynch, mas também em relação ao prognóstico e tratamento; dentre algumas diferenças, CCR esporádicos MSI-H podem estar associados a maiores taxas de ocorrência de tumores metacrônicos, melhor prognóstico e maior benefício com uso de quimioterapia em tumores estágio III (sem metástase linfonodal), além da possibilidade de tratamento de primeira linha com pembrolizumabe para tumores metastáticos, assim como pacientes portadores de CCR com fenótipo MSS e MSI-L, nos estágios I e II, apresentam maior sobrevida, com uso de quimioterapia com 5-fluorouracil <sup>(20,21)</sup>. Todavia, os critérios de indicação de pesquisa de MSI em CCR esporádicos ainda se encontram em debate, sendo utilizadas informações sobre a localização da lesão, histórico familiar, idade e alterações histopatológicas características, como por exemplo presença de diferenciação mucinosa, infiltrado linfóide intratumoral (> 2 linfócitos/campo grande aumento), reação linfóide Crohn-like, dentre outras, para se indicar tais análises <sup>(20)</sup>.

A metilação de determinados genes é característica de neoplasias que surgem no cólon direito e apresentam um padrão morfológico compatível com lesões serrilhadas <sup>(6)</sup>. Esta via, chamada também de via serrilhada, caracteriza-se pela mutação na porção promotora dos genes *BRAF* (predominantemente) ou *KRAS*, com progressão do acúmulo de alterações genéticas através da metilação de genes supressores tumorais e de reparo do emparelhamento errôneo (MMR), podendo ou não cursar com instabilidade microsatélite <sup>(5)</sup>.

Esta é uma via que, embora relacionada aos pólipos serrilhados, possui um padrão heterogêneo entre vias menores que se sobrepõem, algumas ainda por serem definidas. É constituída por lesões que apresentam características genéticas e morfológicas distintas, agrupando desde lesões precursoras até pouco tempo consideradas como sem qualquer relação com progressão para malignidade, como os pólipos hiperplásicos, até lesões pouco frequentes e potencialmente portadoras de displasia, como os adenomas serrilhados. Esta via possui como o protótipo a chamada Síndrome da Polipose Serrilhada (SPS), caracterizada por um número elevado de lesões serrilhadas no intestino grosso (22).

Da mesma forma que a nomenclatura dos pólipos serrilhados evoluiu ao longo do tempo, o conhecimento da biologia molecular destas lesões também veio mostrando crescente acúmulo de informações. A alteração molecular mais característica destas lesões é a ativação da via MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), que ocorre através da mutação do oncogene *BRAF* (mutação V600E) e a hipermetilação de genes supressores tumorais (fenótipo CIMP +) e/ou do reparo do emparelhamento errôneo (MSI) (23). Cerca de 80% a 90% das lesões serrilhadas sésseis (LSS) exibem mutação do *BRAF* e esta característica também está presente no pólipo hiperplásico microvesicular (PHMV), o que contribui para a teoria de uma origem comum ou evolução entre estas lesões (24).

Além da mutação no *BRAF*, a via de sinalização MAPK encontra-se comumente alterada em CCR e lesões precursoras através da mutação do gene *KRAS*. Estas mutações são mutuamente excludentes e a mutação do *BRAF* exhibe grande especificidade para pólipos serrilhados (24). Descreve-se esta

mutação, por exemplo, em 62% das criptas ectópicas em lesões serrilhadas, 70 a 76% dos PHMV, 61 a 100% das LSS e 64 a 100% dos LSS com displasia citológica ou câncer invasivo associado, sendo raro no PHRCC <sup>(24)</sup>. Por sua vez, a mutação do KRAS foi descrita com uma frequência de 50% dos PHRCC, sendo, porém, rara nos PHMV <sup>(24)</sup>.

A via MAPK de sinalização mostra-se ativada também nos Adenomas Serrilhados Tradicionais (AST), porém a proporção entre *BRAF* e *KRAS* varia bastante em diferentes estudos, possivelmente relacionado à baixa frequência deste tipo de lesão, além das dificuldades de classificação. A frequência de mutação do *BRAF* e do *KRAS* para AST varia, respectivamente, entre 27 e 55% e de 29 a 46% <sup>(24,25)</sup>.

Outro importante fenômeno, que ocorre precocemente na via serrilhada, é a hipermetilação de regiões CpG do DNA, conhecida como CIMP. Este representa a hipermetilação de múltiplas sequências de dinucleotídeos citosina-guanina (CpG), chamadas de regiões ou ilhas CpG, frequentemente localizadas nas regiões promotoras do DNA onde, a hipermetilação aberrante promove o silenciamento em cascata de toda uma sequência, com redução da expressão gênica. Os locais de hipermetilação podem ser os mais diversos e são alvos de contínua investigação acerca de seu papel na via serrilhada <sup>(25,26)</sup>.

A hipermetilação de alguns genes específicos ocorre na maioria dos CRC, mas o padrão global de metilação é que caracteriza alguns dos tumores da via serrilhada como um fenótipo CIMP-H (CIMP High) ou CIMP+. Este padrão pode ser detectado através da pesquisa de um painel de genes por graus de metilação através da técnica de *Methylation-Specific Protein Chain Reaction*

(MS-PCR), como por exemplo: *MLH1*, *MGMT* (*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*), *p16*, “*methyated in tumor-1, 2 e 31*” (*MINT-1; MINT2; MINT31*), além o gene *Adenomatous Poliposi Coli (APC)*, dentre outros <sup>(15,18,26)</sup>. Os tumores CIMP-H apresentam também MSI por hipermetilação do gene *MLH1*, correspondendo a cerca de 15% de todos os CRC e 4% dos cânceres retais, estando clinicamente associados com idade avançada, gênero feminino e localização do tumor mais proximal <sup>(15)</sup>.

Mutações do BRAF estão muito associadas com tumores CIMP+, ao contrário do observado em tumores com mutação do *KRAS* (tumores costumeiramente MSS) <sup>(15)</sup>. As taxas de frequência de tumores CIMP+ nas diversas lesões serrilhadas costumam acompanhar a frequência de mutações do gene BRAF, e variam de 47 a 73% nos PHMV, 70 a 76% das LSS e 80% dos LSS com displasia citológica (LSS-CD), sugerindo que, da mesma forma que a mutação do BRAF, seja um evento precoce no surgimento das lesões serrilhadas. Há relato da detecção de metilação do DNA na mucosa normal de intestinos de pacientes que apresentavam lesões serrilhadas em outras localizações <sup>(26)</sup>.

Com relação aos AST, existem poucos estudos abordando o CIMP, mas descrevem-se frequências de até 79%, com taxas menores em AST, *KRAS* mutados, do que aqueles com mutação no BRAF <sup>(24)</sup>. Por sua vez, vale lembrar que o padrão CIMP+ pode ser visto em alguns adenomas convencionais, contudo menos comumente que em LSS e não acompanhados de mutações no BRAF ou MSI <sup>(23)</sup>.

A hipermetilação da região promotora do gene de reparo do emparelhamento errôneo *MLH-1* está relacionada com o desenvolvimento de MSI em CCR esporádicos, levando ao surgimento de CCR microssatélite-instáveis (CCR-MSI). É um fenômeno considerado mais tardio na via serrilhada, estando presente em praticamente todos os pólipos serrilhados de pacientes que apresentaram CCR-MSI. Existem, entretanto, LSS que evoluem para câncer através de mutação do *BRAF* e hipermetilação (CIMP-H), para CCR microssatélite-estáveis (CCR-MSS, *microssatelite stable colorectal carcinoma*)<sup>(10)</sup>.

Um estudo de *Renaud F e cols*, descreveu a hipometilação (ao contrário do padrão de hipermetilação, mais comumente descrito) do gene relacionado à formação da mucina *Mucin 5AC Gene (MUC5AC)* como um evento precoce no surgimento de lesões serrilhadas, particularmente PHMV e LSS, *BRAF* mutados, CIMP+ ou MSI, podendo vir a ser um outro marcador que contribua para a identificação de lesões da via serrilhada<sup>(28)</sup>.

Por sua vez, a importância da via de sinalização WNT e mutação do *p53* em lesões serrilhadas, como visto nas lesões adenomatosas convencionais, tem sido alvo de debate, podendo ser importante à época do desenvolvimento da displasia<sup>(26)</sup>. O WNT é uma proteína de ligação de receptores da membrana celular cuja sinalização estabiliza o complexo de degradação APC-Axina-GSK3b (*Glycogen Synthase Kinase 3 Beta Gene*). Quando a APC é silenciada através de mutação, o fator de transcrição beta-catenina deixa de ser degradado por este complexo e passa a acumular-se no núcleo, integrando-se com *T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor 1 (TCF/LEF)* e

determinando a transcrição de potenciais alvos em cascata relacionados à promoção da oncogênese <sup>(26)</sup>. O padrão de expressão imuno-histoquímica da beta-catenina nas células da mucosa intestinal é de membrana, porém quando há mutação da *APC* a expressão torna-se nuclear, indicando seu acúmulo <sup>(10)</sup>.

A expressão anômala de beta-catenina tem sido descrita com frequência em lesões serrilhadas, sendo maior de acordo com a progressão tumoral, embora o papel da ativação da via de sinalização WNT ainda não esteja bem definido para este tipo de lesão <sup>(10,26)</sup>. Da mesma forma, esta via de sinalização pode também ser alterada por mutações e metilação de outros genes participantes da via, além do *APC*. Estudos analisando a expressão do *BRAF* e da beta-catenina mostraram que ambas tendem a coexistir, com uma frequência de acúmulo de beta-catenina nuclear em até 90% dos tumores com mutação no *BRAF*, particularmente LSS, LSS-CD e CCR <sup>(10,26)</sup>, sugerindo que a via de sinalização WNT possui papel tanto na via serrilhada, quanto na via usual de carcinogênese, através de metilação. Outros possíveis genes implicados, que normalmente inibem a via WNT e podem apresentar-se metilados e inativados em LSS, favorecendo o acúmulo de beta-catenina nuclear são o *Secreted Frizzled-Related Protein (SFRP)*, o *Caudal Type Homeobox 2 Gene (CDX2)* e o *Mutated In Colorectal Cancers Gene (MCC)*; todos mostram-se metilados em LSS e não em PH, exceto o último que já aparece alterado epigeneticamente em PH <sup>(26)</sup>.

Por fim o *p53*, um gene supressor tumoral envolvido com a regulação do ciclo celular e controle da apoptose, pode apresentar-se mutado, com acúmulo nuclear em algumas LSS e AST, principalmente em áreas de displasia; esta é

uma alteração comum em CCR e adenomas que surgem pela via convencional, sendo incomum em lesões da via serrilhada que apresentam mutações do BRAF, CIMP ou MSI, mas mostra-se positivo em 50% dos cânceres com mutação do BRAF, CIMP+, MSS (sem metilação do *MLH1*). Possivelmente as alterações dos genes do *p53* e *MLH1* são eventos críticos que direcionam os CCR para MSS ou MSI, respectivamente. De forma semelhante ao observado na via WNT, a inativação da via do *p53* pode ocorrer não por mutação do gene do *p53*, mas por metilação do *Insulin Like Growth Factor Binding Protein 7 Gene (IGFBP7)* <sup>(26)</sup>. *Kaji e cols*, sugeriram que embora a metilação do *MLH1* e do *IGFBP7* possam coexistir, a ordem de ocorrência dos mesmos pode ser definitiva para a histologia da lesão, a primeira determinando lesões do tipo LSS e a segunda, relacionada ao surgimento de AST <sup>(29)</sup>.

Em suma, com relação aos LSS, a mutação do *BRAF* é fortemente relacionada ao *status* CIMP-H em LSS ou CCR-MSI, sendo provavelmente a mutação *BRAF* e o CIMP, os fenômenos mais precoces, identificados em PHMV e LSS sem displasia citológica. A perda da função do *MLH1* através da metilação de regiões promotoras deste gene parece ser um evento mais tardio, dado que é identificado com maior frequência em LSS-CD, nas regiões displásicas <sup>(10)</sup>. Acredita-se que exista na via serrilhada uma progressão das lesões a partir do PHMV, para LSS e depois para LSS-CD até os CCR, caracterizada pela aquisição de mutações no *BRAF* e aumento progressivo de CIMP e MSI; este fenótipo molecular de metilação e instabilidade pode ser identificado inclusive na mucosa intestinal desprovida de lesões visíveis nestes pacientes, em cada segmento, com tendência de aumentar em direção ao cólon proximal <sup>(23)</sup>.

Por sua vez, em relação aos AST, a caracterização molecular é menos clara, em parte devido à sua baixa frequência, sendo, entretanto, descritas como principais alterações a mutação do *KRAS* e a hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, com uma frequência muito inferior de mutação do *BRAF*, em comparação com os LSS<sup>(10)</sup>. Com relação ao fenótipo de metilação CpG, podem ou não os apresentar, assim como não mostram metilação do *MLH1*, sendo, portanto, microssatélite-estáveis (MSS). A hipermetilação do *MGMT* tem sido observada tanto em lesões fenótipos CIMP+ ou CIMP-<sup>(23)</sup>. Embora alguns PH, particularmente o PHRCC, possam partilhar alterações moleculares comuns aos ASTs (por ex: mutações do *KRAS* e metilações do *MGMT*), a definição clara de um precursor ainda está por ser definida<sup>(23)</sup>.

#### **2.1.4 Papel de Biomarcadores na Via Serrilhada Colorretal**

##### **2.1.4.1 BRAF**

O gene *BRAF* encontra-se mutado em uma grande variedade de neoplasias, sendo responsável pela transcrição de uma serina-treonina quinase, ativadora da via proteína-quinase mitógeno ativada (MAPK). Em cerca de 95% dos cânceres encontra-se presente a mutação V600E a qual, está presente em até 15% dos carcinomas colorretais e, comumente associada aos fenótipos CIMP+ e MSI-H, usualmente através de mecanismos epigenéticos (metilação)<sup>(30)</sup>.

Por outro lado, a presença de mutação do *BRAF* não ocorre em casos hereditários de instabilidade microssatélite, como na Síndrome de Lynch, motivo pelo qual a pesquisa de mutação do *BRAF* tem sido realizada em casos de

carcinoma colorretal com fenótipo de instabilidade microssatélite, para separar casos esporádicos de hereditários <sup>(30)</sup>.

Fazem parte da mesma via os genes *KRAS* e *NRAS*, cujas mutações ativadoras constituem um potente efeito de cascata de sinalização em outros genes da mesma via, como o *BRAF*, o qual é responsável pela ativação de proteino-quinases mitógeno ativadas - *Mitogen-activated protein kinase kinase* (1,2) (MEK1 e MEK2), estimulando a atividade proliferativa e sobrevivência celular; todavia, a mutação isolada do *BRAF* é suficiente para produzir sinalização em cascata, independente das vias regulatórias superiores. As mutações neste gene parecem ser fenômenos precoces na via serrilhada de carcinogênese, estando presente em até 76% dos pólipos hiperplásicos microvesiculares e entre 75 e 90% das lesões serrilhadas sésseis <sup>(31)</sup>.

Usualmente a expressão da proteína *BRAF* com a mutação V600E é detectada por métodos moleculares (reação em cadeia de polimerase – PCR), contudo esta avaliação pode ser feita através de método de imuno-histoquímica através de anticorpo específico para a mutação V600E (anticorpo *BRAF VE1*), com valores de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo de 96,1%, 94% e 89,1%, respectivamente <sup>(32,33)</sup>. Adicionalmente, a mutação V600E é mutuamente exclusiva em relação às mutações do gene *KRAS* <sup>(34,35)</sup>.

O padrão de expressão imuno-histoquímica observado é descrito como citoplasmático, podendo variar de fraco a forte; adicionalmente pode ser observada marcação nuclear, porém, que não deve ser considerada como positiva, quando não associada à expressão citoplasmática <sup>(32-34, 86)</sup>.

#### 2.1.4.2 Anexina A10

Dentre os genes comumente expressos em pólipos serrilhados, descritos na literatura, o gene da *Anexina A10* é um dos mais frequentemente identificados <sup>(36)</sup>. O produto de sua expressão é uma proteína ligante de fosfolípídeo, regulada por cálcio, membro da família das anexinas e envolvida em processos de diferenciação, crescimento celular e apoptose <sup>(37,38)</sup>.

A *Anexina A10* é expressa na mucosa gástrica (células foveolares e glandulares de mucosa normal de antro e corpo) assim como em células de glândulas de Brünner no duodeno e no urotélio da pelve renal <sup>(38,39)</sup>. Todavia, expressão aberrante desta proteína foi observada em mucosa metaplásica de esôfago de Barrett, além de cânceres orais, pancreáticos e pulmonares <sup>(38,39)</sup>.

Foi demonstrado em alguns estudos que a *Anexina A10* pode ser um marcador da via serrilhada, com aumento da expressão em lesões serrilhadas sésseis (LSS) em comparação com a mucosa colônica normal e pólipos hiperplásicos microvesiculares (PHMV) <sup>(39,40)</sup>.

A sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de LSS em um dos estudos foi de 73% e 95%, respectivamente <sup>(40)</sup>, enquanto outro estudo demonstrou valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de carcinomas colorretais com histologia serrilhada de 42% e 98%, respectivamente <sup>(38)</sup>.

O padrão de expressão mais comumente descrito, considerado como positivo, é marcação nuclear ou nuclear e citoplasmática, preferencialmente acima de 5% das células. A expressão somente citoplasmática deve ser considerada como não específica e não positiva <sup>(36,38)</sup>.

### 2.1.4.3 Ki-67

A expressão de Ki-67 relaciona-se com a atividade proliferativa, uma vez que é uma proteína presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0, mostrando relação direta com a fração de crescimento de uma população celular <sup>(41)</sup>.

*Tortakovic e cols* <sup>(42)</sup> descreveram a diferença entre a distribuição das áreas proliferativas (Ki-67positivas) e diferenciadas (CK20 positivas) entre os pólipos serrilhados e não-serrilhados do intestino grosso. Na mucosa normal e de pólipos hiperplásicos, tanto a porção proliferativa, quanto a diferenciada da cripta, mostraram-se bem demarcadas com o uso do Ki-67 e da CK20, ou seja, foi possível identificar a positividade apenas para o Ki-67 no compartimento distal das criptas (porção proliferativa) e apenas para CK20 nas porções mais proximais, melhor diferenciadas, contendo células maduras, mucossecretoras. Nas demais lesões, observou-se um padrão de distribuição irregular (lesões serrilhadas sésseis), difuso (adenomas convencionais) ou ainda, restrito às criptas ectópicas (adenomas serrilhados tradicionais), em se tratando da expressão nuclear do Ki-67; por sua vez, a expressão de CK20 demonstrou características morfológicas próprias, muitas vezes análogas aos padrões de marcação do Ki-67, com expressão preferencialmente na porção apical, diferenciada, das criptas.

Desta forma, na mucosa normal, foram descritos dois compartimentos bem definidos, conforme explicado acima, um positivo para o Ki-67 e correspondendo à porção basal, proliferativa das criptas e outro, mais proximal, positivo para CK20, nas porções mais apicais das glândulas, porém distantes (separados) entre si; já os pólipos hiperplásicos mostraram expansão e

aproximação das duas áreas, contudo bem definidas, estando a zona proliferativa restrita à porção basal e com expressão pelo Ki-67. As lesões serrilhadas sésseis exibiram irregularidade na distribuição das duas áreas, com deslocamento da zona proliferativa para porções mais apicais (Ki-67 positivas) e extensão da área diferenciada (CK20 positivas), para as bases das criptas, enquanto os adenomas serrilhados tradicionais exibiram positividade para Ki-67 restrita às criptas ectópicas. Não foi observado um padrão específico para adenomas convencionais, que comumente exibiram positividade difusa para o marcador, porém com áreas de ausência de expressão <sup>(42)</sup>.

#### 2.1.4.4 MLH-1

A presença de fenótipo de metilação (CIMP-H), particularmente do *MLH-1*, é reconhecido como um marcador molecular da via serrilhada e um marco na progressão de lesões serrilhadas sésseis <sup>(43)</sup>.

O *MLH-1* é um dos genes responsáveis pela prevenção do emparelhamento errôneo do DNA durante a divisão celular e o seu silenciamento através de metilação de sua região promotora é causa de instabilidade microssatélite, relacionado a modificações importantes nas sequências de microssatélites e, conseqüentemente ao surgimento de inúmeras mutações <sup>(44)</sup>.

A presença de fenótipo MSI-H relacionado ao silenciamento do gene *MLH-1* mostra-se quase que invariavelmente relacionado ao surgimento de displasia (LSS-CD) – as quais são raramente diagnosticadas, muito provavelmente, pela rápida progressão para carcinoma, em virtude da alta pressão exercida pela carga mutacional relacionada a esta condição <sup>(45)</sup>.

A presença do estado CIMP-H mostrou em um estudo, correlação com idade acima de 51 anos, localização de lesão em cólon proximal e tamanho acima de 5 mm, parecendo ser um fenômeno mais tardio na via serrilhada de carcinogênese e, subsequentemente, relacionado à progressão tumoral <sup>(46)</sup>.

Conforme observado, a maioria das LSS-CD exibindo metilação do gene MLH-1, mostra perda completa de expressão imuno-histoquímica nas criptas displásicas, embora possa ser observada apenas perda parcial da expressão deste marcador, particularmente relacionado à área de displasia. Desta forma, é possível que se identifiquem áreas de perda focal da expressão, relacionadas apenas aos núcleos das células mostrando alterações displásicas <sup>(44,47)</sup>.

#### 2.1.4.5 MUC-1

As mucinas englobam um grupo de diferentes glicoproteínas de alto peso molecular produzidas por células epiteliais da mucosa gastrointestinal e os genes relacionados à sua produção são chamados de genes *MUC* <sup>(48)</sup>.

O gene *Mucin 1 Gene (MUC-1)* leva à produção de uma proteína transmembrana, raramente expressa na mucosa colorretal normal e pode estar expressa em cânceres colorretais <sup>(49)</sup>. Outros tipos de mucinas como *Mucin 6 Gene (MUC-6)* e *Mucin 5AC Gene (MUC5AC)*, que são mucinas do tipo gástrico, também não expressos na mucosa colorretal normal e podem estar envolvidos em estágios iniciais e finais da carcinogênese colorretal <sup>(50,51)</sup>.

Um estudo apontou a expressão de MUC-1 em 23,3% dos pólipos colorretais de uma amostra, a maioria em adenomas convencionais (23,5%) e rara em lesões serrilhadas sésseis (7,8%), não tendo sido expresso em nenhum pólipo hiperplásico ( $p < 0,0001$ ) <sup>(48)</sup>. Este padrão de expressão, sugere que o

*MUC-1* possa, em conjunto com outros marcadores, contribuir na diferenciação entre os diferentes tipos de pólipos colorretais, particularmente pólipos hiperplásicos pela ausência de expressão deste marcador.

## 2.2 LESÕES PRECURSORAS

Os pólipos colorretais podem ser divididos, de uma maneira geral, entre aqueles pertencentes à via clássica de carcinogênese (adenomas colorretais) e os relacionados à via serrilhada (pólipos hiperplásicos, lesões serrilhadas sésseis com e sem displasia e adenomas serrilhados tradicionais, além de variantes recentes descritas e ainda não bem estabelecidas) (44, 52, 53). Os próximos tópicos abordarão características morfológicas próprias destas lesões.

### 2.2.1 Adenomas Convencionais

Os adenomas colorretais convencionais são neoplasia benignas (pré-malignas) da mucosa intestinal, tendo como substrato molecular principal a instabilidade cromossômica, resultante do acúmulo de alterações gênicas na via WNT, que se iniciam, em sua maioria, a partir da mutação APC-Beta catenina (52).

O aumento da atividade proliferativa relacionada às mutações iniciais determina as irregularidades celulares e arquiteturais que são reconhecidas como displasia convencional no nível microscópico, sendo elas a hiper Cromasia e pseudoestratificação nuclear, o aumento do número de glândulas associada à perda de estroma interglandular levando ao fenômeno conhecido como “crowding”, a presença de nucléolos evidentes, assim como mitoses e a redução da atividade mucossecretora das células (52).

Macroscopicamente podem se apresentar como lesões elevadas pediculadas ou de base sésil (alargada), ou ainda planas, levemente sobrelevadas ou até deprimidas. Em termos microscópicos podem apresentar arquitetura tubular ou vilositária; dependendo do percentual apresentado de formações tubulares ou vilosas, o adenoma pode ser classificado como tubular (até 25% de vilosidades), viloso (acima de 75%) ou túbulo-vilosos (compreendendo entre 25 a 75% de vilosidades) <sup>(52)</sup>.

A displasia presente neste tipo de lesão pode ser dividida em baixo e alto grau; são características da displasia de alto grau maior complexidade e irregularidade arquiteturais, acompanhadas de arquitetura cribriforme, necrose intraluminal, perda de polaridade e estratificação nuclear, além de padrão de cromatina dispersa e figuras de mitose <sup>(52)</sup>.

## **2.2.2 Classificação e Características Morfológicas das Lesões Serrilhadas**

### **2.2.2.1 pólipos hiperplásicos**

Os pólipos hiperplásicos constituem o tipo de lesão serrilhada mais comumente observado <sup>(54,55)</sup>, correspondendo a cerca de 24 a 42% de todos os pólipos intestinais e a cerca de 83 a 96% das lesões serrilhadas <sup>(5,54,55)</sup>. São normalmente pequenos, com menos de 5,0 mm e sésseis. Do ponto de vista histológico são constituídos por glândulas exibindo epitélio colunar com células caliciformes, criptas alongadas e dilatadas. Acredita-se que a inibição da apoptose seja o mecanismo subjacente à formação destes pólipos, visto que existe acúmulo de células epiteliais por cripta, levando a um aspecto serrilhado ou micropapilar nas luzes glandulares <sup>(10)</sup>. Possuem criptas retificadas que se

estendem simetricamente da superfície do pólipo até a muscular da mucosa, sem distorção arquitetural importante, com distensão de suas luzes em sua porção apical, maior do que em sua base, e sem padrão de ramificação horizontal ou irregular.

Da mesma forma, o padrão de serrilhamento é mais pronunciado na metade apical das criptas e em sua superfície <sup>(23)</sup>. Além disso, a membrana basal sob o epitélio mostra-se espessada. Alterações epiteliais reativas e figuras mitóticas, com presença de núcleos ovais ou levemente alongados, sem estratificação ou hiperchromasia, podem ser características proeminentes nas bases das criptas, não devendo ser confundidas com displasia <sup>(10)</sup>.

Atualmente reconhecem-se pelo menos dois tipos morfológicos de pólipos hiperplásicos, que parecem situar-se em posições diferentes dentro da via das lesões serrilhadas. Dependendo do subtipo, o epitélio pode ser revestido por vários tipos celulares, incluindo células mucinosas microvesiculares, caliciformes, neuroendócrinas e indiferenciadas <sup>(23)</sup>.

O tipo histológico mais comum é o pólipo hiperplásico microvesicular (PHMV), que exhibe células epiteliais contendo muco, com células caliciformes em menor número, em comparação com as criptas normais; mostram serrilhamento importante de suas luzes, principalmente em sua porção apical. Localizam-se mais frequentemente no cólon esquerdo, sendo comuns no reto, embora 10 a 15% destes possam estar localizados nos cólons direito e transversos <sup>(23)</sup>.

O segundo tipo corresponde a cerca de um terço do total, denominado “rico em células caliciformes” (PHRCC) e exibe numerosas células com esta característica, sem células com mucina microvesicular, e com menor padrão de serrilhamento apical. Este tipo é mais comumente encontrado no cólon esquerdo e reto. Curiosamente, o PHMV mais frequentemente demonstra mutações no gene *BRAF* e, enquanto os PHRCC podem exibir mutações no gene *KRAS*, em contraste com os PHMV, onde as mutações do *BRAF* são vistas em 66 a 75% dos casos, o que sugere que dentro da via serrilhada possam originar lesões distintas e encontrar-se em diferentes caminhos <sup>(23)</sup>.

De fato, na prática diária não se recomenda a subclassificação dos pólipos hiperplásicos, exceto no contexto da Síndrome de Polipose Serrilhada (SPS) <sup>(53)</sup>, caracterizada pela combinação de PHMV e LSS em maior frequência e, em um contexto que aparentemente está relacionado com a via serrilhada <sup>(24)</sup>.

Um terceiro tipo anteriormente descrito e raramente identificado, o tipo “pobre em mucina” (PHPM), é caracterizado pela menor quantidade de mucina microvesicular e células caliciformes, com maior atipia nuclear em células basais <sup>(27)</sup>; pouco se sabe sobre as características moleculares relacionadas a este tipo, e uma teoria era a de que correspondessem a PHMV com alterações epiteliais reativas secundárias a inflamação <sup>(23,53)</sup>. A edição de 2019 da publicação da Organização Mundial de Saúde não considera mais o PHPM como um tipo em particular <sup>(53)</sup>.

#### 2.2.2.2 lesões serrilhadas sésseis

Com relação às demais lesões características da via serrilhada, em 1990 *Longacre e Fenoglio* <sup>(3)</sup> descreveram alguns pólipos de arquitetura serrilhada que

apresentavam características morfológicas comuns aos adenomas convencionais a aos pólipos hiperplásicos, passando a denominá-los pólipos mistos hiperplásicos/adenomatosos – adenomas serrilhados. Em 1996, Torlakovic e cols <sup>(11)</sup> identificaram um outro grupo de lesões serrilhadas, dentro da Síndrome de Polipose Serrilhada (SPS), mostrando arquitetura anormal, com displasia citológica, tendo os definido como “Adenomas Serrilhados Sésseis (SSAs, *Sessile Serrated Adenoma*)”, que atualmente são considerados lesões precursoras para CCR com MSI <sup>(15)</sup>.

A prevalência dos SSA foi subestimada por anos, correspondendo desde 0,1% a 14,7 % de todos os pólipos colorretais. A diferenciação destes dos demais pólipos e, dos adenomas convencionais, torna-se fundamental, a partir da identificação de um perfil morfológico e molecular próprio relacionado à via serrilhada de carcinogênese, com características de prognóstico, acompanhamento e resposta a tratamento distintas dos CCR tradicionais <sup>(15)</sup>.

Pela primeira vez, no ano 2000, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passa a descrever dois tipos principais de lesões serrilhadas, os pólipos hiperplásicos (metaplásicos) e adenomas serrilhados, além de pólipos mistos hiperplásicos / adenomatosos <sup>(61)</sup>.

Em 2010, a Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>(9)</sup> classificou as lesões serrilhadas em três principais categorias: a. pólipos hiperplásicos típicos, englobando os subtipos PHMV, PHRCC e PHPM; b. adenomas serrilhados sésseis, que nesta classificação passam a receber a denominação de adenomas/pólipos serrilhados sésseis (SSA/P, *Sessile Serrated Adenoma / Polyp*), divididos entre aqueles com e sem displasia citológica, podendo ainda a

displasia ser caracterizada como convencional (semelhante aos adenomas convencionais, não-serrilhados) e serrilhada, com características histológicas próprias deste tipo de lesão e; c. adenomas serrilhados tradicionais (AST).

Em julho de 2019, a 5ª Edição da publicação da OMS <sup>(53)</sup> passa a considerar os seguintes tipos histológicos: a. pólipos hiperplásicos microvesiculares (PHMV) e rico em células calciformes (PHRCC); b. lesões serrilhadas sésseis (LSS) categorizados como com e sem displasia, podendo ainda a displasia ser caracterizada como convencional (semelhante aos adenomas convencionais, não-serrilhados) e serrilhada, com características histológicas próprias deste tipo de lesão ; c. adenomas serrilhados tradicionais (AST); e d. pólipos serrilhados não-classificáveis, englobando lesões com características intermediárias entre LSS e AST, bem como “adenomas túbulo-vilosos serrilhados”. Esta última variável aparentemente substitui a denominação anterior de “pólipos mistos”. Denominações semelhantes às que passaram a ser utilizadas pela OMS em 2019, já eram preconizadas pelo consenso britânico de 2017, que utilizavam as terminologias “pólipo hiperplásico, lesões serrilhadas sésseis com e sem displasia, adenoma serrilhado tradicional e pólipos mistos” <sup>(15,62)</sup>.

As LSS e AST, de uma maneira geral, têm em comum a aparência “denteada” das luzes de suas criptas. Costumeiramente mostram dimensões maiores do que dos PH e, em sua maioria, ocorrem no cólon direito (LSS) <sup>(55)</sup>.

O diagnóstico é baseado principalmente no padrão distorcido e desorganizado das criptas, principalmente na porção basal, onde as LSS mostram serrilhamento de toda extensão da cripta, incluindo sua base, que se

mostra dilatada e com ramificações horizontais formando um padrão do tipo “L” ou “T invertido”, ou ainda descrito como um padrão “em bota”, diferentemente de outras lesões serrilhadas, incluindo o PH. Por esta razão, é difícil a distinção entre PH, particularmente os PHMV, e LSS em biópsias superficiais ou com artefatos de diatermia, secundários à ressecção endoscópica, uma vez que a análise da totalidade da superfície da cripta faz-se imprescindível <sup>(57)</sup>.

As criptas dos LSS tendem a se mostrar dispostas paralelamente à muscular da mucosa e algumas vezes, mostrar herniação através da mesma, sem representar invasão. São revestidas por células colunares claras, com citoplasma menos eosinofílico do que as observadas em AST. A presença de células mucinosas nas bases de suas criptas pode levar ao acúmulo de muco e dilatação de suas luzes, o que as diferencia substancialmente de PH, que mostram luzes estreitas em suas bases, revestidas por células proliferativas <sup>(10)</sup>.

Outro ponto importante de discussão é se as LSS são lesões que surgem *de novo* ou se originam de PH, particularmente PHMV. A identificação de LSS puras e as diferenças em suas localizações preferenciais (cólon esquerdo para PHMV e cólon direito para LSS), suportam a primeira teoria acima. Entretanto, a identificação frequente de áreas de PHMV em LSS de grandes dimensões, associado à presença de hipermetilação e mutações do *BRAF* vistos em cerca de 66 a 75% dos PHMV, e em torno de 85% dos LSS, sugere que os LSS possam ser de fato lesões que representem formas avançadas de PHMV <sup>(24)</sup>.

O critério para o diagnóstico para as LSS definido pela OMS em 2010 era a presença de lesões com as características histopatológicas anteriormente descritas (serrilhamento e dilatação em toda extensão da cripta, presença de

células mucinosas na base, ramificação lateral ou horizontal em forma de “L” etc.) em pelo menos três criptas (ou duas criptas adjacentes) <sup>(9)</sup>. Entretanto, para a Associação Americana de Gastroenterologia, bastava que estas alterações fossem observadas em apenas uma cripta para o diagnóstico <sup>(23)</sup>.

Estas orientações diferentes para o diagnóstico das lesões serrilhadas causam confusão e diferenças no percentual de identificação das mesmas, contudo, acredita-se que cerca de 20 a 30% das lesões anteriormente classificadas como pólipos hiperplásicos correspondam atualmente a LSS e AST, conforme observado em estudos que visam a reclassificação destas lesões <sup>(10,12,15)</sup>. A partir da publicação de 2019, a OMS alterou o critério para “a presença de pelo menos uma cripta serrilhada contendo distorções arquiteturais inequívocas (não sutis)” <sup>(53)</sup>; a implicação destas mudanças na concordância interobservador ainda está por ser definida.

As LSS podem apresentar atipias nucleares e citoplasmáticas com características similares à displasia de baixo e alto grau observadas em adenomas convencionais; nestas situações costuma-se identificar áreas bem definidas de displasia citológica em meio a um LSS sem displasia <sup>(57)</sup>.

Têm sido demonstrado que estas áreas de displasia quase sempre mostram a perda de imunexpressão do *MHL1* devido à inativação do seu gene, o que não é uma característica usual da via de carcinogênese adenoma-adenocarcinoma, sendo mais comumente ligada à via de MSI <sup>(15)</sup>.

Ao mesmo tempo, os focos de displasia retêm o padrão de mutação do gene *BRAF* visto no restante do LSS. A identificação de displasia é considerada

um marcador de risco para a progressão para CCR, tendo sido observado que LSS que desenvolvem esta característica mostram rápido aumento de tamanho à observação endoscópica. Além disso, frequentemente identifica-se foco de displasia em LSS que sofrem malignização, embora seja pouco frequente a identificação de LSS com displasia em pólipos de indivíduos sem história de CCR (15,23).

O tipo de displasia observada em LSS também pode ser variada, contudo a importância da diferenciação e de sua graduação ainda é um ponto a ser definido. O tipo mais comum, que é a displasia convencional (semelhante à dos adenomas convencionais), é caracterizada pela presença de células alongadas com núcleos pseudoestratificados, alongados e hiper cromáticos, citoplasma anfófilico e número aumentado de mitoses. Embora em adenomas convencionais a graduação em baixo e alto grau seja realizada, não está clara a importância de graduação nos LSS, sendo recomendado considerar lesões com displasia citológica como um pólipo de risco, com um manejo semelhante aos adenomas de alto grau (58).

Um segundo tipo de displasia, menos descrita e estudada, é a chamada “displasia serrilhada”, raramente vista em LSS e mais comum em AST, identificada como a proliferação de células atípicas com formato mais cuboidal do que cilíndrico, com citoplasma eosinofílico, núcleo aumentado de tamanho com cromatina vesicular e nucléolo proeminente com número aumentado de mitoses; tal padrão é considerado por alguns autores um marcador de progressão tumoral (23).

### 2.2.2.3 adenoma serrilhado tradicional

O terceiro tipo de Pólipo Serrilhado corresponde ao Adenoma Serrilhado Tradicional (AST). Este tipo de pólipo normalmente mostra configuração exofítica protuberante, padrão de arquitetura vilosa com extremidades arredondadas, revestidas por grande número de células colunares com citoplasma eosinofílico e núcleos alongados e pseudoestratificados <sup>(59)</sup>.

Um achado característico é a presença das chamadas “criptas ectópicas”, que surgem perpendicularmente ao maior eixo de estruturas vilosas. A formação de criptas ectópicas parece estar relacionada à perda de ancoragem normal delas à muscular da mucosa <sup>(60)</sup>.

Tanto a displasia do tipo convencional como a serrilhada podem ser encontradas nos AST, entretanto discute-se se este padrão nuclear com citoplasma eosinófilo de fato representa uma alteração displásica ou metaplásica, uma vez que se mostra diferente do padrão citológico e arquitetural da displasia convencional. A prevalência geral deste tipo de lesão é de 0,6% <sup>(10,23)</sup>.

Com a progressão neoplásica da lesão, acredita-se que os AST apresentem níveis crescentes de atipia citológica previamente ao desenvolvimento do carcinoma. Não há, entretanto, um consenso a respeito da identificação e graduação da displasia em AST, sendo recomendável a graduação de modo semelhante à de adenomas convencionais (baixo e alto grau) <sup>(53)</sup>. Um estudo mostrou que 25% dos AST estudados apresentavam displasia de alto grau e 8% foco de carcinoma intramucoso <sup>(12)</sup>.

A displasia serrilhada de alto grau caracteriza-se pela presença de células com citoplasma acentuadamente eosinofílico (o que por si já é uma característica dos AST não displásicos), associado a núcleo aumentado, hipercromasia, estratificação nuclear e aumento da atividade mitótica. O risco de malignização no AST e a rapidez de progressão ainda estão por ser definidos <sup>(23)</sup>.

O perfil molecular dos AST trata-se de um capítulo à parte, considerando o contexto das alterações características da via serrilhada, apresentando grande heterogeneidade, o que em parte pode ser atribuído à terminologia confusa das lesões serrilhadas em geral <sup>(23)</sup>.

Algumas variantes morfológicas deste tipo de lesão foram descritas como os Adenomas Serrilhados Tradicionais Planos e os “Ricos em Mucina”; este último parece apresentar-se rico em células caliciformes e possuírem mais frequentemente mutações do *BRAF*, do que *KRAS*, o que o torna um potencial precursor de CCR BRAF+, usualmente de pior prognóstico <sup>(44)</sup>.

Os dados disponíveis até o momento sugerem que os AST não façam parte da mesma via relacionada às LSS com ou sem displasia citológica, ou pelo menos, parte dos AST, visto que caracteristicamente não apresentam hipermetilação do gene *MLH1* e mutações do *BRAF*, podendo ainda abrigar mutações do *KRAS* e *p53* <sup>(44)</sup>.

Os AST são lesões relativamente raras, correspondendo a cerca de 0,1 a 0,6% de todos os pólipos e, localizando-se predominantemente no cólon esquerdo (outra diferença com relação à LSS); mostram-se como lesões sésseis,

porém protuberantes e facilmente reconhecidas. Do ponto de vista histológico podem ser mais facilmente confundidos com adenomas vilosos e, diante destas controvérsias com relação a que tipo de via de carcinogênese pertencem, acredita-se que sejam mais bem conduzidas, em termos de acompanhamento e tratamento, como adenomas tubulares de mesmo tamanho <sup>(16)</sup>.

#### 2.2.2.4 pólipos serrilhados não classificáveis

Esta é uma categoria introduzida na última classificação da OMS, com a finalidade de incluir pólipos serrilhados onde seja difícil a distinção, principalmente entre AST e LSS com displasia. São incluídos neste grupo entidades recentemente descritas, como o adenoma túbulo-viloso serrilhado e o adenoma serrilhado superficial <sup>(44,53)</sup>. Possivelmente, dada à incerteza das características próprias deste grupo de lesões, não foram descritos, nesta edição, os critérios microscópicos para esta categoria <sup>(53)</sup>.

### **2.2.3 Características Colonoscópicas Observadas em Lesões Serrilhadas Colorretais.**

Os pólipos serrilhados, particularmente as LSS costumam apresentar morfologia mais plana, o que pode levar a uma maior dificuldade de detecção na colonoscopia por profissionais menos treinados, resultando em menor sensibilidade. Ainda assim, a colonoscopia ótica ainda é o melhor método para detecção de pólipos serrilhados <sup>(56)</sup>.

Em relação às classificações endoscópicas de Paris (relacionada à morfologia e elevação da lesão em relação à mucosa) e Kudo (considerando a visualização da arquitetura das criptas mucosa), a grande maioria das lesões serrilhadas são planas ou minimamente elevadas (Paris IIa) e com padrão de

criptas estrelar, ou tipo II de Kudo, cujo uso da cromoendoscopia pode facilitar a sua visualização <sup>(56,79)</sup>. O quadro 1, abaixo, exemplifica os padrões colonoscópicos principais das classificações de Paris e Kudo.

Quadro 1: Resumo das Classificações Endoscópicas de Paris e Kudo <sup>(88)</sup>.

Paris		Kudo	
<b>Ip</b>	Pediculado	I	Redondo (normal)
<b>Isp</b>	Subpediculado	II	Asteroide ou Estrelar
<b>Is</b>	Séssil	III <sub>s</sub>	Tubular ou redondo (luzes menores que o tipo I)
<b>IIa</b>	Levemente elevado	III <sub>L</sub>	Tubular ou redondo (luzes maiores que o tipo I)
<b>IIb</b>	Completamente plano	IV	Dendrítico ou Giriforme
<b>IIc</b>	Levemente deprimido	Vi	Irregular (porém com tamanhos dos tipos III <sub>s</sub> , III <sub>L</sub> e IV)
<b>III</b>	Escavado	Vn	Não estruturado (muito irregular)

Fonte: Adaptado de Tanaka S e cols <sup>(88)</sup>.

### 2.3 A EVOLUÇÃO DAS CLASSIFICAÇÕES DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE

De acordo com a classificação da OMS 2019, as lesões serrilhadas intestinais, são classificadas em PH, LSS, LSS-CD, AST e adenomas serrilhados não classificáveis <sup>(53)</sup>. A nomenclatura destas lesões passou por mudanças nas classificações e critérios diagnósticos nas últimas três décadas, recebendo denominações diferentes como pólipos misto hiperplásico-adenomatoso, adenoma serrilhado, pólipos/adenoma serrilhado etc. <sup>(9,53,61)</sup>. Os quadros 2 e 3 trazem as classificações dos pólipos serrilhados dos últimos 20 anos e as principais diferenças histológicas entre os diferentes tipos de pólipos serrilhados. A figura 2 ressalta características morfológicas importantes de LSS e AST.

Quadro 2: Evolução na classificação dos pólipos serrilhados.

Publicações da OMS		
OMS 2000 <sup>(61)</sup>	OMS 2010 <sup>(9)</sup>	OMS 2019 <sup>(53)</sup>
a. Pólipos hiperplásicos (metaplásicos); b. Adenomas serrilhados; c. Pólipos mistos hiperplásicos / adenomatosos.	a. Pólipos hiperplásicos (microvesiculares, ricos em células caliciformes e pobres em mucina); b. Polipo/Adenoma Serrilhado Sésil com e sem displasia citológica; c. Adenoma serrilhado tradicional. d. Pólipos mistos.	a. Pólipos hiperplásicos (microvesiculares, ricos em células caliciformes); b. Lesão serrilhada sésil; c. Lesão serrilhada sésil com displasia; d. Adenoma serrilhado tradicional. e. Adenoma serrilhado não classificável.

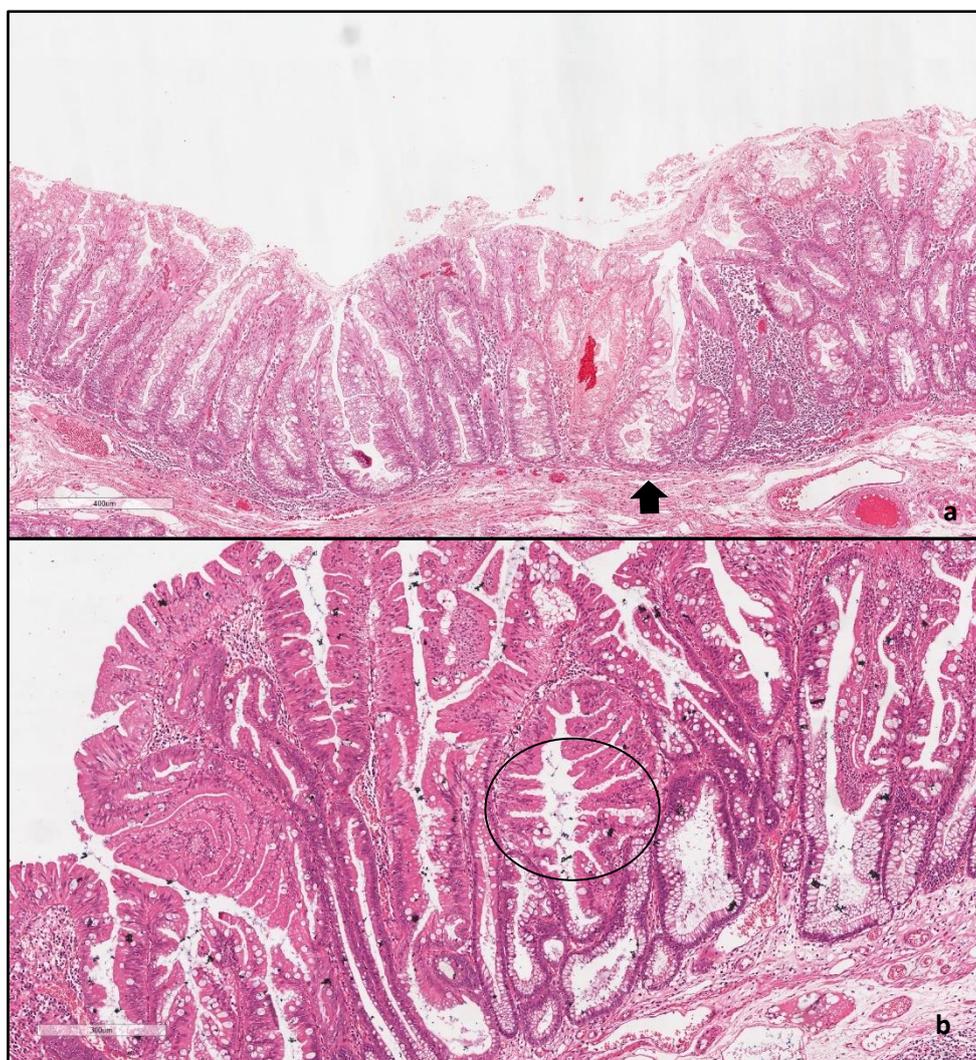


Figura 2: (A) Lesão Serrilhada Sésil, com característica ramificação lateral da base da cripta (seta) (100 X / 400 µm); (B) Adenoma Serrilhado Tradicional, com padrão de serrilhamento fendiforme (“slit like”), ressaltado pelo círculo (40X / 300 µm).

Quadro 3: Tipos de pólipos serrilhados e suas características histológicas.

Tipos de lesões serrilhadas	Características histológicas principais	Características histológicas menos frequentes
<b>Pólipos hiperplásicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Zona proliferativa confinada à base da cripta;</li> <li>b. Serrilhamento mais pronunciado na metade superior da cripta;</li> <li>c. Criptas lineares e retas sem distorção;</li> <li>d. Diferentes tipos de células de revestimento epitelial, de acordo com o tipo de pólipo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Espessamento mucoso localizado;</li> <li>b. Ramificação individual pode ocorrer;</li> <li>c. Núcleos pequenos, redondo a ovais e basais.</li> </ul>
<b>Adenoma serrilhado tradicional</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Citoplasma eosinofílico e núcleos alongados;</li> <li>b. Formação de criptas ectópicas;</li> <li>c. Arquitetura vilosa.</li> <li>d. Serrilhamento em fenda (<i>slit like</i>).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Forma plana do AST apresenta pouca ou nenhuma cripta ectópica;</li> <li>b. Células caliciformes esparsas, porém, abundantes na forma rica em mucina;</li> <li>c. Em até 50% dos casos, um outro componente serrilhado precursor pode ser identificado.</li> </ul>
<b>Lesão serrilhada Sésil</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Criptas com dilatação assimétrica e/ou ramificadas;</li> <li>b. Serrilhamento presente em toda a extensão da cripta, incluindo a base;</li> <li>c. Extensão horizontal da base da cripta em “T, L ou J invertido”;</li> <li>d. Herniação das criptas através da muscular da mucosa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Células microvesiculares e caliciformes;</li> <li>b. Zona proliferativa na porção média da cripta.</li> <li>c. Não necessariamente apresentam displasia (apenas cerca de 5% são lesões com displasia).</li> </ul>

## 2.4 REPRODUTIBILIDADE DOS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS E CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADOR

A literatura destaca uma grande dificuldade por parte dos patologistas na adoção e interpretação dos critérios até então existentes para a classificação das lesões serrilhadas <sup>(27,65-69)</sup>. Parte desta dificuldade provavelmente está relacionada às diferentes denominações aplicadas ao longo deste período, bem como à subjetividade e o “peso” dos critérios histológicos aplicados. Ademais, existem ainda peculiaridades de cada tipo de pólipos, que levam a confusão com um ou mais de um tipo histológico (não necessariamente apenas com pólipos serrilhados).

Um ponto importante a ser discutido é que os principais estudos que abordam esta questão, levam em consideração o percentual de reclassificação de pólipos hiperplásicos em adenomas serrilhados, pólipos mistos, pólipos/adenoma serrilhados sésseis e adenomas serrilhados tradicionais, ou ainda a concordância inter e/ou intra-observador através do cálculo do coeficiente *kappa*, com base nas classificações, denominações e critérios da OMS de 2000 e 2010 <sup>(6,53,61)</sup>, a depender da época do artigo.

Como exemplo, *Rau e cols*<sup>(67)</sup> em 2014, descrevem um estudo com 200 pólipos (serrilhados e convencionais), onde 41 casos (20,5%) apresentaram diagnósticos discordantes e que, a utilização da classificação de 2010 da OMS<sup>(6)</sup> - cujo critério mínimo para o diagnóstico para pólipo/adenoma serrilhado era a presença das características citológicas e arquiteturais descritas em pelo menos 2 criptas adjacentes (ou 3 não adjacentes), levou a uma redução no diagnóstico de pólipos/adenomas serrilhados e um aumento no diagnóstico de pólipos

hiperplásicos, em razão de um critério mais rígido<sup>(67)</sup>. Atualmente, com alteração do critério para apenas 01 cripta contendo as alterações características, possivelmente deva haver mudanças nos padrões de concordância interobservador, não tendo ainda, aparentemente, sido publicado estudo que aborde esta questão.

Dentre os artigos pesquisados na literatura, um dos primeiros estudos sobre o tema, foi realizado por *Khalid e cols* em 2009, utilizando uma casuística de 40 pólipos hiperplásicos diagnosticados em 2001 por patologistas sem experiência em patologia do trato gastrointestinal (TGI)<sup>(70)</sup>. A proposta do trabalho foi a revisão destes casos por 03 patologistas especializados em patologia do TGI em 2007, à luz dos conhecimentos daquela época. Os autores demonstraram que cerca de 30 a 85% (dentre os 03 avaliadores) dos pólipos hiperplásicos foram reclassificados como adenomas serrilhados, resultando em um *kappa* de 0,16 (concordância mínima ou fraca).

*Gill e cols*<sup>(71)</sup>, em 2013 realizaram um estudo de revisão e reclassificação de casos diagnosticados como pólipos hiperplásicos do cólon direito de 2009 a 2012 utilizando, contudo, os critérios de recomendação da Associação Americana de Gastroenterologia, descritos em *Rex e cols*<sup>(23)</sup>, (mínimo de 01 cripta contendo as alterações histológicas características), critério atualmente adotado na classificação de 2019 da OMS<sup>(53)</sup>. O resultado encontrado foi uma faixa percentual de reclassificação de 30 a 64% (em média 42%, ao longo dos 4 anos) dos casos, principalmente para o diagnóstico de Pólipo/Adenoma Serrilhado Sésil; como exemplo, no ano de 2009, não havia registro de diagnóstico de nenhum pólipo/adenoma serrilhado sésil e 66 diagnósticos de pólipos hiperplásicos em cólon direito; destes, 30% dos casos foram

reclassificados como pólipos/adenomas e 1% como adenomas serrilhados tradicionais. Por sua vez, o percentual de reclassificação dos pólipos/adenomas serrilhados sésseis foi observado em torno de 5% dos casos, sugerindo que a maior dificuldade resida na diferenciação destas lesões dos pólipos hiperplásicos.

*Wong e cols*<sup>(65)</sup>, em 2009, descreveram concordância geral entre observadores de seu estudo de 42% e coeficiente *kappa* de 0,49 (moderada), considerando todos os tipos de lesão, e 0,38 (razoável) para adenomas serrilhados e 0,53 (moderada) para pólipos hiperplásicos. Todavia, este estudo não faz distinção entre adenomas serrilhados tradicionais e pólipos/adenomas serrilhados sésseis.

Em comparação com o estudo anterior, *Farris e cols*<sup>(68)</sup>, em 2008, apresentaram uma concordância interobservador quase perfeita ( $k > 0,80$ ) para o diagnóstico de adenoma serrilhado tradicional, contudo não incluindo em sua casuística lesões com diagnóstico de adenoma convencional ou pólipo misto, o que provavelmente reduziu a possibilidade de discordância entre os observadores; foram obtidos ainda valores de *kappa* para as demais categorias, que variaram entre 0,45 e 0,47 para Adenomas Serrilhados Sésseis, 0,42 a 0,52 para Pólipos Hiperplásicos e 0,46 a 0,58 para todas as lesões em geral (concordância moderada).

Um dos mais citados trabalhos nos diferentes estudos sobre concordância interobservador para lesões serrilhadas, foi o estudo de *Glatz e cols*<sup>(69)</sup>. Para este estudo foi realizado um *quiz* via internet, com fotos de 20 lesões e 168 observadores, em diferentes países, no qual foram admitidos 04 diagnósticos (pólipos hiperplásicos, adenomas túbulo-vilosos, adenomas serrilhados sésseis

e adenomas serrilhados tradicionais). Foi questionada quais as denominações mais utilizadas pelos participantes em seus países, o que resultou em uma miríade de mais de 19 terminologias diferentes utilizadas, dentre elas: pólipo serrilhado com proliferação anômala, adenoma serrilhado tradicional misto – adenoma serrilhado sésil, pólipo misto hiperplásico-adenomatoso, dentre outras <sup>(69)</sup>. Ressalte-se também deste estudo que o percentual médio de concordância foi de aproximadamente 48%, tendo sido os Adenomas Serrilhados Sésseis mais confundidos com Pólipos Hiperplásicos e Adenomas Serrilhados Tradicionais e, os Adenomas Serrilhados Tradicionais mais confundidos com adenomas túbulo-vilosos. Chama a atenção que 9,4% dos participantes da pesquisa alegaram nunca terem utilizado a terminologia adenoma serrilhado para diagnóstico.

Outros dois estudos trazem dados importantes sobre os níveis de concordância interobservador em diferentes séries. Um deles, de *Rau e cols*<sup>(67)</sup>, um estudo de 2014 com 200 lesões, com diagnósticos de adenomas convencionais, serrilhados, pólipos hiperplásicos e mistos. A concordância interobservador geral foi moderada a boa (kappa entre 0,56 e 0,68) para o diagnóstico geral dos pólipos, porém a análise da concordância entre o uso dos critérios citológicos e arquiteturais para o diagnóstico, apresentaram grandes variações e baixos níveis de concordância, principalmente entre adenomas serrilhados sésseis (SSA) e adenomas serrilhados tradicionais (AST), dentre eles a inversão (*kappa* 0,25) e dilatação de criptas (0,38), formação de criptas ectópicas (0,25) e citoplasma eosinofílico (0,06). Foram ainda calculadas as variações nos diagnósticos em diferentes cenários, a saber: A (antes da

divulgação dos critérios para diagnóstico), B (após a divulgação de idade, sexo e localização das lesões) e C (após a divulgação de consenso dos critérios).

O estudo acima chama ainda a atenção para a maior mudança observada nos diagnósticos de adenomas serrilhados sésseis e pólipos hiperplásicos, principalmente após a divulgação de critérios histopatológicos de consenso para a classificação das lesões e, uma dificuldade dos patologistas de aplicarem critérios semiquantitativos, fatos estes já abordados em outros estudos, onde a utilização de critérios como uma ou duas criptas para o diagnóstico, parecem apresentar expressiva modificação em tendência de um ou outro diagnóstico (67,71).

Por fim, o estudo de *Ensari e cols*<sup>(66)</sup>, em 2012, com uma amostra de 70 casos e realizada em duas etapas, uma antes de discussão de consenso e a segunda, após definição de critérios com base na classificação da OMS de 2010 (6), alcançou-se uma concordância de 0,318 e 0,557 (fraca a moderada), respectivamente. Chama a atenção que, após a definição dos critérios, a concordância dos valores de *kappa* para os diagnósticos de pólipos hiperplásicos, adenoma serrilhado sésseis e adenoma serrilhado tradicional, aumentaram de 0,415, 0,301 e 0,433 para 0,977, 0,912 e 0,845, respectivamente; contudo, a persistência do *kappa* global como 0,557, possivelmente deveu-se à fraquíssima concordância na categoria de pólipos mistos (0,158), que inclusive reduziu após a divulgação dos critérios. Além disso, é flagrante que não foram introduzidos nesta casuística os adenomas convencionais, os quais podem não só representar uma dificuldade de diagnóstico com adenomas serrilhados tradicionais e com os pólipos mistos (interpretados neste estudo como equivalentes aos adenomas serrilhados sésseis com displasia).

Este estudo<sup>(66)</sup> também avaliou a concordância entre os critérios histopatológicos, semelhantemente ao estudo de *Rau e cols*<sup>(67)</sup>, tendo sido identificados como critérios com maiores níveis de concordância, o serrilhamento de criptas superficiais ( $k = 0,97$ ), serrilhamento epitelial superficial ( $k = 0,83$ ), mitoses na porção basal ( $k = 0,79$ ), células calciformes nas criptas superficiais ( $k = 0,77$ ), dilatação na porção superficial das criptas ( $k = 0,72$ ) e etc. Os critérios com maior capacidade de discriminação para cada categoria diagnóstica foram: serrilhamento, dilatação e células calciformes nas criptas superficiais em pólipos hiperplásicos; serrilhamento, dilatação horizontal de criptas basais e núcleos vesiculosos com nucléolos em adenomas serrilhados sésseis e; a presença de criptas ectópicas, eosinofilia citoplasmática, pseudoestratificação, hiper Cromasia e alongamento nuclear nos adenomas serrilhados tradicionais. Assim, sugere-se que critérios arquiteturais apresentem maior capacidade discriminatória para pólipos hiperplásicos e adenomas serrilhados sésseis e, critérios citológicos apresentem maior peso no diagnóstico de adenomas serrilhados tradicionais.

O quadro 4 abaixo reúne os principais trabalhos na literatura voltados para a concordância interobservador em relação ao diagnóstico de pólipos serrilhados. De uma maneira geral, a maioria dos estudos demonstrou concordâncias muito fracas a regular, com poucos estudos evidenciando boa concordância <sup>(65,70,72,74)</sup>. Desta forma, mostra-se necessária a reavaliação dos critérios morfológicos para a classificação dos pólipos serrilhados, bem como a contribuição dos marcadores imuno-histoquímicos no diagnóstico destas lesões e o possível aumento na reprodutibilidade destes critérios e da concordância interobservador.

Quadro 4: Níveis de concordância interobservador em diferentes estudos.

<b>Autores</b>	<b>Número de casos</b>	<b>Concordância Interobservador</b>
<b>Baldin e cols 2015</b> <sup>(72)</sup>	n=310 (PH/ASS/AC)	Muito fraca
<b>Rau e cols 2014</b> <sup>(67)</sup>	n=200 (PH/ ASS/AST/AC/ OL/ PM)	Regular a boa
<b>Gill e cols 2013</b> <sup>(14)</sup>	n=797 (PH/ ASS)	30 a 64% PH reclassificados como LSS, período de 04 anos (kappa não calculado)
<b>Ensari e cols 2012</b> <sup>(66)</sup>	n=70 (PH/ ASS /AST/PM)	Boa (geral)e Muito boa para PH, SSA e AST
<b>Gunia e cols 2011</b> <sup>(73)</sup>	n=19 (ASS/AST/ PI)	Fraca a regular
<b>Bustamante-Balen e cols 2009</b> <sup>(74)</sup>	n=195 (PH/ ASS)	Muito fraca
<b>Wong e cols 2009</b> <sup>(65)</sup>	n=60 (PH/ ASS /PM/AC/ Outras Lesões)	Fraca
<b>Khalid e cols 2009</b> <sup>(70)</sup>	n=40 (PH/AST)	Muito fraca
<b>Farris e cols 2008</b> <sup>(68)</sup>	n=185 (PH/ ASS /AST)	Boa

PH – Pólipo hiperplásico; ASS – Adenoma Serrilhado Sésil; AST – Adenoma Serrilhado Tradicional; AC – Adenoma Convencional; PI: Pólipos inflamatórios; PM: Pólipos mistos; OL: Outras lesões.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

1) Aplicar a classificação da Organização Mundial de Saúde de 2019 a uma amostra de lesões serrilhadas colorretais e analisar suas características diagnósticas, clínico-epidemiológicas, morfológicas e imuno-histoquímicas.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1) Correlacionar as características morfológicas estudadas com os diferentes tipos de lesões serrilhadas colorretais.

2) Correlacionar os padrões de expressão à imuno-histoquímica dos anticorpos anti: BRAF, Anexina A10, MUC1, MLH1 e Ki-67 com as lesões serrilhadas colorretais.

3) Propor a utilização de um escore que possa ser aplicado no diagnóstico das lesões serrilhadas sésseis.

4) Comparar os adenomas convencionais com as lesões serrilhadas em relação às características diagnósticas, clínico-epidemiológicas, morfológicas e imuno-histoquímicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram estudados pólipos de intestino grosso (adenomas convencionais e pólipos serrilhados colorretais - pólipos hiperplásicos, lesões serrilhadas sésseis com e sem displasia e adenoma serrilhados tradicionais) de pacientes submetidos a biópsia ou ressecção, durante os anos de 2015 a 2019 (05 anos). As amostras estudadas foram provenientes do Serviço de Patologia do Hospital Naval Marcílio Dias.

Foi realizada pesquisa em prontuário informatizado para cada paciente incluído no estudo, referente a idade, sexo, tipos de pólipos colorretais excisados e suas respectivas localizações (topografia). Das amostras selecionadas, lâminas contendo cortes histológicos corados pelo método de Hematoxilina e Eosina foram revistas por 03 médicos patologistas visando classificar os pólipos colorretais (lesões serrilhadas e adenomas convencionais) de acordo com os critérios da OMS 2019 <sup>(53)</sup>.

Durante o desenvolvimento do estudo, foi necessária a revisão das lâminas coradas pelo método da Hematoxilina e Eosina. O estudo, iniciado em 2018, teve como a primeira seleção 243 casos, anteriormente à revisão das lâminas, diagnosticados entre 2015 a 2018, apenas com base nos diagnósticos dos laudos anatomopatológicos. Esta casuística inicial era composta por 144 adenomas convencionais (59%), 85 pólipos hiperplásicos (35%) e somente 14 pólipos serrilhados, considerando os diagnósticos de pólipo misto hiperplásico-adenomatoso, adenoma serrilhado, pólipo/adenoma serrilhado sésseis e adenoma serrilhado tradicional (6%).

Diante da situação anteriormente apresentada, houve necessidade de aumentar a casuística, principalmente para se alcançar um número de lesões serrilhadas sésseis e adenomas serrilhados tradicionais, que permitissem a execução do estudo; partiu-se, portanto, de um total 1248 casos de lesões descritas e biopsiadas como pólipos no período inicialmente estudado (2015 a 2018), das quais apenas 445 dispunham de lâminas em arquivo para revisão. Após a revisão, foi observada uma baixa concordância com os diagnósticos inicialmente dados, permanecendo na casuística 90 adenomas convencionais (90% de resultados concordantes com o diagnóstico inicial), 50 pólipos hiperplásicos (34% de concordância) e, ainda, as mesmas 14 lesões serrilhadas sésseis iniciais (7% de concordância, em um total de 195 lesões com este diagnóstico!).

Com o advento da nova classificação da OMS de 2019<sup>(53)</sup> foi realizado novo levantamento de casos, utilizando-se os novos critérios para a reclassificação, estendendo-se o estudo para amostras do ano de 2019, elevando-se para um total de 511 casos, dos quais 261 lesões foram diagnosticadas dentro das denominações historicamente utilizadas para o denominação de lesões serrilhadas sésseis (pólipo misto hiperplásico-adenomatoso, adenoma serrilhado, pólipo/adenoma serrilhado séssil e adenoma serrilhado tradicional), totalizando 80 lesões, com 31% de concordância com o diagnóstico inicial, após revisão em consenso pelos 03 pesquisadores. Deste levantamento inicial portanto, 220 casos foram mantidos (considerando os já concordantes 50 pólipos hiperplásicos, 90 adenomas convencionais e 80 pólipos serrilhados-não PH e, após a etapa de separação dos blocos de parafina para

análise, apenas 172 casos permaneceram no estudo, elegíveis para a realização das técnicas de imuno-histoquímica.

#### 4.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Foram considerados critérios de inclusão, amostras provenientes de biópsias ou ressecção de pólipos colorretais com os diagnósticos de adenoma convencional (tubular, viloso ou túbulo-viloso), pólipo hiperplásico, pólipo misto hiperplásico – adenomatoso, adenoma serrilhado, pólipo/adenoma serrilhado séssil, lesão serrilhada séssil (com ou sem displasia) e adenoma serrilhado tradicional, baseado nos novos critérios da OMS <sup>(53)</sup>, provenientes de pacientes de ambos os sexos, acima de 18 anos.

#### 4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão considerados foram a ausência de material no bloco de parafina suficiente para a realização de estudo imuno-histoquímico, além de amostras exibindo autólise, artefatos de natureza técnica ou orientação inadequada da amostra no bloco de parafina.

#### 4.4 VARIÁVEIS DIAGNÓSTICAS E CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS

Foram consideradas como variáveis diagnósticas e clínico-epidemiológicas aquelas relacionadas ao diagnóstico, localização e distribuição da lesão dentro da população estudada. Desta forma, foram pesquisados o diagnóstico da lesão, a faixa etária (idade) dos indivíduos, a localização (topografia) da lesão no intestino e o sexo dos pacientes.

Em relação ao diagnóstico foi utilizada a classificação atual da OMS, de 2019 <sup>(53)</sup>, tendo sido considerados os seguintes diagnósticos: adenoma convencional, pólipo hiperplásico (microvesicular e rico em células caliciformes),

lesão serrilhada séssil (com e sem displasia) e adenoma serrilhado tradicional. As características morfológicas consideradas para cada diagnóstico, a partir da classificação acima referida <sup>(53)</sup>, encontram-se descritas no quadro 5, abaixo:

Quadro 5: Características morfológicas em relação aos diagnósticos.

Diagnósticos	Características morfológicas
Pólipos hiperplásicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serrilhamento mais pronunciado na metade superior da cripta;</li> <li>• Zona proliferativa confinada à base da cripta;</li> <li>• Criptas lineares e retas sem irregularidade arquitetural ou distorção; e</li> <li>• Presença de células do tipo microvesicular ou caliciforme no revestimento das criptas.</li> </ul>
Lesões Serrilhadas Sésseis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Irregularidade arquitetural inequívoca, presente em pelo menos uma das criptas, caracterizada por serrilhamento presente em toda a extensão da cripta;</li> <li>• Dilatação e extensão horizontal da base da cripta em “T, L ou J invertido”; Criptas com dilatação assimétrica e/ou ramificadas; e</li> <li>• Herniação das criptas através da muscular da mucosa.</li> </ul>
Adenoma Serrilhado Tradicional	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citoplasma eosinofílico;</li> <li>• Núcleos alongados;</li> <li>• Formação de criptas ectópicas; Arquitetura vilosa; e</li> <li>• Serrilhamento em fenda (“slit like”)</li> </ul>
Adenoma Convencional	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Criptas apresentando formação tubular e/ou vilosa;</li> <li>• Pseudoestratificação nuclear;</li> <li>• Proliferação de criptas com redução do córion inter-glandular (“crowding”);</li> <li>• Displasia convencional ou serrilhada</li> </ul>

Para a avaliação da idade foram consideradas 03 faixas etárias: menores de 50 anos, entre 50 e 70 anos e maiores de 70 anos de idade; a literatura mostra que a maior parte dos pólipos colorretais ocorre acima dos 50 anos e os carcinomas colorretais na faixa entre 60 e 70 anos <sup>(1,53)</sup>, razão pela qual foram escolhidas as 03 faixas etárias em questão.

Para a variável sexo foram considerados sexo biológico masculino e feminino e, para a avaliação da topografia os seguintes segmentos do intestino grosso foram assim estudados: ceco, cólon ascendente e cólon transversal (cólon direito) e, cólon descendente, sigmoide e reto (cólon esquerdo).

#### 4.5 ESTUDO MORFOLÓGICO

O diagnóstico anatomopatológico de pólipos serrilhados depende de uma série de características morfológicas, citológicas e arquiteturas, descritas ao longo dos últimos 30 anos <sup>(3,9,11,53,61)</sup>, sendo algumas de caráter qualitativo (por exemplo, presença ou não de displasia e de qual tipo) e outras quantitativas ou semi-quantitativas (número de glândulas exibindo distorção arquitetural) e, além destas, o emprego do estudo imuno-histoquímico, de maneira qualitativa ou semi-quantitativa, avaliando a expressão (ou sua ausência) de proteínas relacionadas ao processo de carcinogênese colorretal.

Para a avaliação de algumas variáveis foram utilizados critérios mais subjetivos, como por exemplo, dilatação da base discreta, prolongamento horizontal discreto e arquitetura vilosa focal; nestes casos, a característica analisada foi observada em não mais que uma ou duas áreas em todo o espécime analisado.

A irregularidade de cripta foi considerada como uma variável semi-quantitativa, variando de 0 (nenhuma), 01, 02 até 03 ou mais criptas, para avaliação do número de glândulas exibindo as alterações características de LSS, como tortuosidade, serrilhamento luminal completo e etc., conforme a OMS 2019 <sup>(53)</sup>.

Em relação ao serrilhamento luminal, é importante ressaltar foi avaliado de acordo com a extensão da tortuosidade interna da luz, que muitas vezes assume aspecto “estrelado” em cortes histológicos transversais e que, a extensão quando restrita ao terço apical em corte longitudinal da cripta, foi considerado como serrilhamento “proximal” e, quando alcançou a totalidade da extensão da luz glandular ou sua porção distal, foi considerado como “distal ou completo”; por fim, quando o padrão do serrilhamento, ao invés de “estrelado”, mostrou padrão “em fenda” ou “slit like”, próprio de AST, passou a receber a denominação de serrilhamento luminal “slit like”. Demais variáveis morfológicas e seus padrões de avaliação, são melhor descritos nos tópicos subsequentes, acompanhados de figuras.

As variáveis morfológicas foram divididas em variáveis citológicas e arquiteturas e variáveis imuno-histoquímicas. Foram consideradas as seguintes variáveis citológicas e arquiteturas e com base nas descrições prévias das lesões, foram divididas em 03 grupos, levando em consideração as características descritas na 5ª edição da classificação da OMS, de 2019 <sup>(53)</sup>:

1. aquelas mais relacionadas às lesões serrilhadas sésseis e pólipos hiperplásicos (irregularidade de cripta, dilatação da base da cripta, prolongamento horizontal, serrilhamento luminal, herniação submucosa, tipo celular predominante);

2. as características próprias de adenomas serrilhados tradicionais (eosinofilia citoplasmática, núcleos alongados ou “pencilados” e criptas ectópicas) e;

3. aquelas mais comumente observadas nos adenomas convencionais (displasia, estratificação nuclear, arquitetura vilosa, “crowding”).

As variáveis imuno-histoquímicas consideradas foram os padrões de expressão nas amostras para BRAF, Anexina A10, Ki-67, MLH-1 e MUC-1, cujos critérios de análise serão descritos nos próximos tópicos.

#### 4.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Foi realizado estudo imuno-histoquímico no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRJ e utilizados os anticorpos abaixo, em suas respectivas diluições, conforme o quadro 6.

Quadro 6: Anticorpos primários utilizados.

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Controles utilizados</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>
BRAF	VE1	Melanoma contendo mutação V600E	Spring™ Bioscience, Pleasanton, CA	1:750
hMLH1	G168-15	Mucosa intestinal	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ	1:200
MUC1	JC8	Adenocarcinoma intestinal	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	1:200
Ki-67	MIB-1	Linfonodo	Dako	1:300
Anexina A10	NBP1-90156	Mucosa gástrica	Novus, Littleton, CO	1:3000

#### 4.6.1 Técnica Imuno-histoquímica.

Para a realização da técnica imuno-histoquímica foram realizados cortes histológicos com espessura de 3  $\mu\text{m}$ , contendo até 10 amostras (a depender dos tamanhos dos espécimes) por lâmina com carga e submetidos ao seguinte protocolo:

1. As lâminas contendo cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$  foram acondicionadas em estufa a 60°C por 120 minutos, em seguida desparafinizadas em 4 banhos de xilol e álcool (100%, 100%, 70% e 50%) e, lavadas em água corrente e água destilada por 10 minutos.
2. Foi realizada a etapa de recuperação antigênica em tampão Citrato de Sódio 10 mM, pH 6,0 a 98°C em calor úmido por 20 minutos.
3. Após recuperação as respectivas lâminas foram retiradas do calor e após atingirem temperatura ambiente foram lavadas em água corrente por 10 minutos, seguida de água destilada e acondicionadas em tampão de lavagem (Tris-HCl, pH 7,6), por 5 minutos duas vezes à temperatura ambiente.
4. Em seguida os cortes foram isolados e submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena pelo peróxido de hidrogênio 0,03% (*NovoLink Max Polymer Detection System – Leica*), por 10 minutos em câmara úmida.
5. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, água destilada e acondicionadas em tampão de lavagem (Tris-HCl, pH 7,6), por 5 minutos duas vezes à temperatura ambiente.
6. Os cortes foram submetidos a bloqueio de proteína (*NovoLink Max Polymer Detection System – Leica*), por 10 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente.

7. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 minutos, água destilada e acondicionadas em tampão de lavagem (Tris-HCl, pH 7,6), por 5 minutos duas vezes à temperatura ambiente.

8. Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e os cortes incubados com 100 µL de anticorpo primário conforme diluições descritas no quadro 5, acima, seguido de incubação *overnight*, a 4°-8°C.

9. No dia seguinte as lâminas foram retiradas da geladeira e após atingirem temperatura ambiente, foram lavadas em água corrente por 10 minutos, água destilada e acondicionadas em tampão de lavagem (Tris-HCl, pH 7,6), por 5 minutos duas vezes à temperatura ambiente.

10. Em seguida os cortes foram incubados em câmara úmida com *Post Primary Block (NovoLink Max Polymer Detection System – Leica)* por 30 minutos e após, lavados em água corrente por 10 minutos, água destilada e acondicionadas em tampão de lavagem (Tris-HCl, pH 7,6), por 5 minutos, duas vezes, à temperatura ambiente.

11. Realizou-se a incubação dos cortes com anticorpo secundário *Polymer (NovoLink Max Polymer Detection System – Leica)* por 30 minutos.

12. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, água destilada e acondicionadas em tampão de lavagem (Tris-HCl, pH 7,6), por 5 minutos, duas vezes, à temperatura ambiente.

13. Para revelação foi utilizado o cromógeno DAB, diluição 50:1000µL (*NovoLink Max Polymer Detection System – Leica*), 100µL por 3 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

14. Realizada lavagem em água corrente e água destilada, por 10 minutos e, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

15. Realizada nova lavagem em água corrente e água destilada.

16. Finalmente, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 100% e 100%), clarificadas em xilol (4 trocas) e montadas, sobrepostas por lamínulas de vidro, com meio de montagem de goma de Damar, diluída em xileno.

#### **4.6.2 Padrões de imunomarcação.**

##### **4.6.2.1 BRAF**

A avaliação de expressão imuno-histoquímica foi realizada de forma qualitativa, com base na intensidade de marcação, tendo sido considerada como negativa (ausência completa de marcação) ou positiva (fraca, moderada ou forte, de acordo com a intensidade de marcação citoplasmática). A presença de marcação nuclear isolada, não foi considerada como positiva, conforme preconizado em estudos prévios <sup>(32-34)</sup>.

##### **4.6.2.2 Anexina A10**

A avaliação de expressão imuno-histoquímica foi realizada de forma semi-quantitativa, utilizando-se pontos de corte em percentual estimado do número de células mostrando marcação citoplasmática e nuclear. São identificados em estudos anteriores <sup>(48,49,63,64)</sup> pontos de corte diferentes contudo, de uma maneira geral, são consideradas positivas a expressão acima de 5% das células e, dentre os casos positivos, aplica-se a diferenciação entre aqueles com menos e mais de 50% de células marcadas. Desta forma, no presente estudo foram

considerados como negativos casos com menos de 5% das células marcadas e, separados os casos positivos com até 50% de células marcadas e acima de 50%.

#### 4.6.2.3 Ki-67

A avaliação da expressão de Ki-67 foi realizada de forma qualitativa, tendo sido considerados os padrões de distribuição da expressão em diferentes pólipos colorretais (serrilhados e convencionais), conforme descrito por *Torlakovic e cols* <sup>(42)</sup>. Desta forma foram considerados como positivos casos com expressão nuclear do marcador, distribuídos em quatro categorias de expressão nuclear do marcador: basal (restrita à porção basal das criptas), irregular (localização da marcação em diferentes áreas das criptas, porém não em sua totalidade), difusa (marcação na totalidade ou quase totalidade das criptas) e em criptas ectópicas (marcação restrita, em sua maioria, às diminutas criptas não ancoradas à membrana basal).

#### 4.6.2.4 MLH-1

A avaliação da expressão do MLH-1 foi feita de modo qualitativo tendo sido considerado como positivo quando observada qualquer expressão nuclear do marcador, com positividade do controle interno (mucosa intestinal normal e células inflamatórias do estroma) e negativo, quando há perda total da expressão nas células de interesse, com manutenção da expressão em células do controle interno, com base no preconizado em protocolo do Colégio Americano de Patologistas <sup>(76)</sup>. Casos com positividade extensa e áreas focais de perda expressão, foram considerados como “perda focal”.

#### 4.6.2.5 MUC-1

A análise deste marcador foi realizada de forma qualitativa, tendo sido considerados três padrões de expressão: negativo (ausência completa de marcação citoplasmática), positivo focal (marcação apenas em áreas focais do citoplasma, de diferentes células) e positivo difuso (marcação de numerosas células).

#### 4.7 ORGANIZAÇÃO DOS DADOS

Os dados obtidos com a quantificação de todas as variáveis estudadas, foram organizados em planilhas elaboradas com o software Excel®.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva apresentou na forma de tabelas os dados observados, expressos pela frequência (n) e percentual (%) para as variáveis categóricas (qualitativos) e pela média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo para a variável idade, quando analisada como uma variável contínua.

A análise inferencial foi composta pelos seguintes métodos: a associação entre os diagnósticos e as variáveis clínico-epidemiológicas, morfológicas e imuno-histoquímicas foi analisada pelo teste exato de Fisher e, pelo teste de Kruskal-Wallis, para a variável idade, quando analisada de forma contínua; para a exploração de associação entre múltiplas variáveis independentes, candidatas a predizerem o diagnóstico de Lesão Serrilhada Sésil, utilizou-se a análise por regressão logística múltipla (*stepwise*). O coeficiente beta representou a magnitude da associação e a proporcionalidade entre os seus diferentes valores e, para todas as variáveis incluídas no modelo, foi utilizado como valor de base para a elaboração do escore. Os valores de *Odds ratio* (OR), sensibilidade e

especificidade para o diagnóstico de Lesões Serrilhadas Sésseis foram calculados considerando um intervalo de confiança de 95% e valor de p inferior a 0,05.

Adicionalmente foi utilizada para definição do ponto de corte do escore, a análise pela curva ROC. A adequação do modelo ajustado foi avaliada através do Teste de Hosmer-Lemeshow. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%. A análise estatística foi processada pelo software estatístico SPSS®, versão 13.0 (1 Sep 2004)

#### 4.9 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto desta tese foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Naval Marcílio Dias e aprovado sob a numeração CAAE 54933216.7.3001.5256 (ANEXO A). Esta tese fundamenta-se nos princípios éticos da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sendo respeitados os princípios de privacidade e confidencialidade dos dados. Foi solicitada e autorizada a isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aos pacientes, visto que foram utilizadas no estudo amostras teciduais já coletadas para o diagnóstico. Assegura-se que a confidencialidade será mantida, garantindo o anonimato do paciente. Por oportuno, os autores comprometeram-se a divulgar todos os resultados desta pesquisa, sendo eles compatíveis ou não com os objetivos traçados no projeto.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 FREQUÊNCIA DAS VARIÁVEIS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS.

#### 5.1.1 Distribuição dos casos por diagnóstico

Dentre os 172 casos incluídos no estudo, 64 (38%) corresponderam a adenomas convencionais e 108 (62%) a pólipos serrilhados agrupados, incluindo pólipos hiperplásicos, lesões serrilhadas sésseis e adenomas serrilhados tradicionais. Os diagnósticos mais frequentes foram os de adenoma tubular (28%), seguido por pólipo hiperplásico microvesicular (23%) e lesão serrilhada sésil (22%). Não foram identificados pólipos serrilhados não-classificáveis na amostra; demais diagnósticos mostraram distribuição conforme a tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Distribuição dos casos por diagnóstico principal.

Distribuição por Diagnóstico		
	Frequência	Percentual (%)
PH MV	40	23%
PH RCC	2	1%
LSS	38	22%
LSS CD	10	6%
AST	18	10%
AT	49	28%
ATV	15	9%
Total	172	100

PH MV – Pólipo hiperplásico microvesicular; PH RCC – Pólipo hiperplásico rico em células caliciformes; LSS – Lesão serrilhada sésil; LSS CD – Lesão serrilhada sésil com displasia; AT – Adenoma tubular; ATV – Adenoma túbulo-viloso; AST – Adenoma serrilhado tradicional.

As figuras 3 até 8 retratam exemplos dos principais tipos de lesões estudadas.

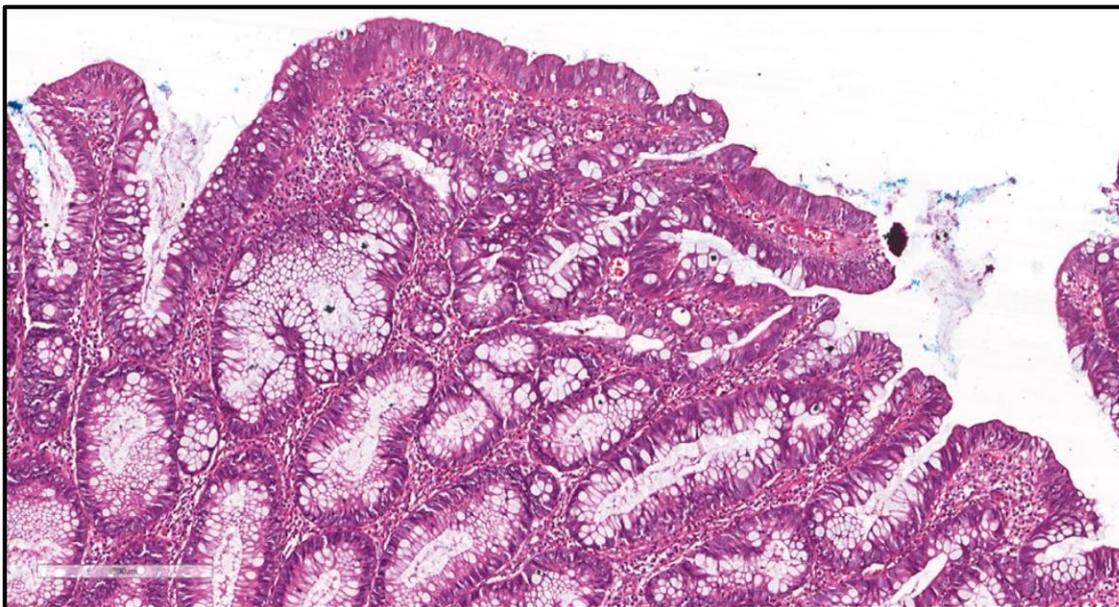


Figura 3: Adenoma convencional. São observadas glândulas de padrão tubular, em sua maioria, com discreta formação de vilos, células caracterizadas pela pseudoestratificação nuclear e células do tipo caliciforme, repletas de mucina. Hematoxilina e Eosina (100 X / 200  $\mu$ m).

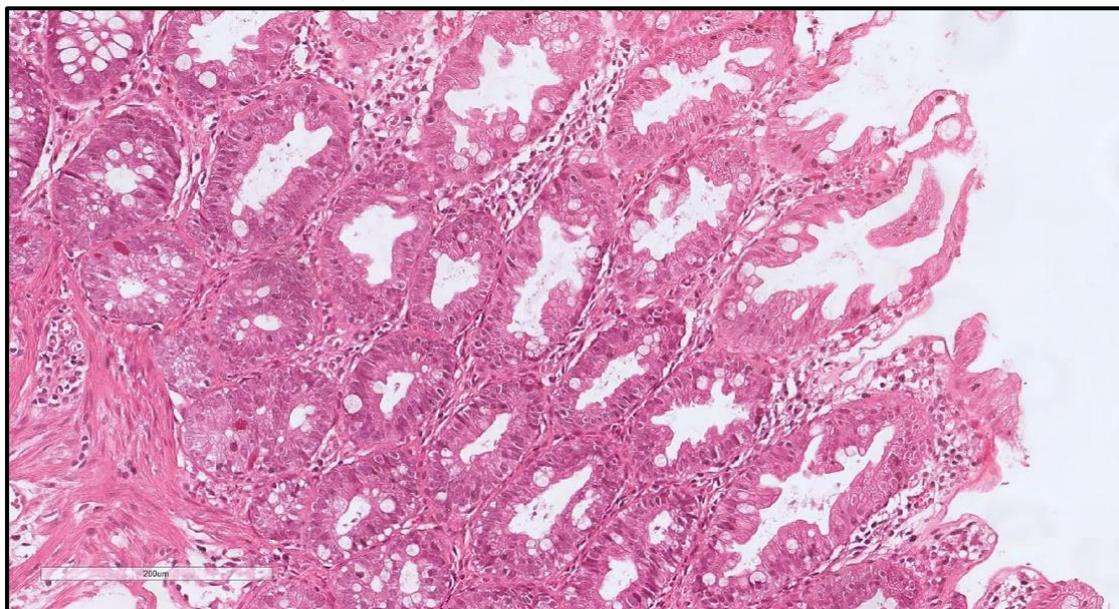


Figura 4: Pólipo hiperplásico microvesicular. As glândulas mostram arquitetura de padrão tubular, com serrilhamento luminal. As células que revestem as glândulas mostram pequenas vesículas contendo mucina (microvesículas). Hematoxilina e Eosina (100 X / 200  $\mu$ m).

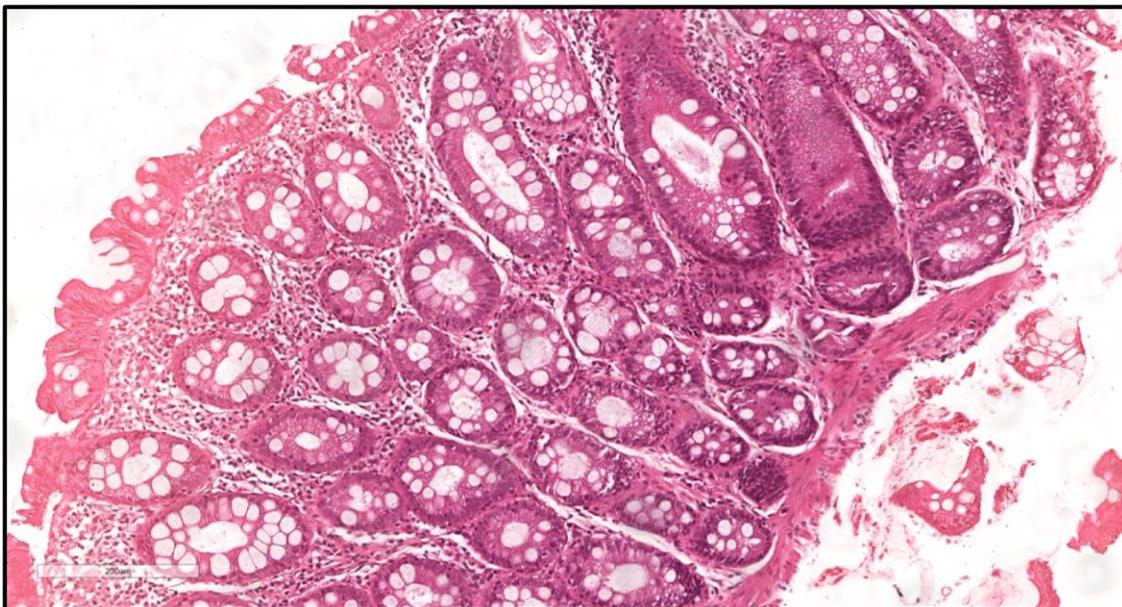


Figura 5: Pólipo hiperplásico rico em células caliciformes, exibindo serrilhamento discreto e restrito à porção superficial das criptas. Hematoxilina e Eosina (100 X / 200  $\mu$ m).

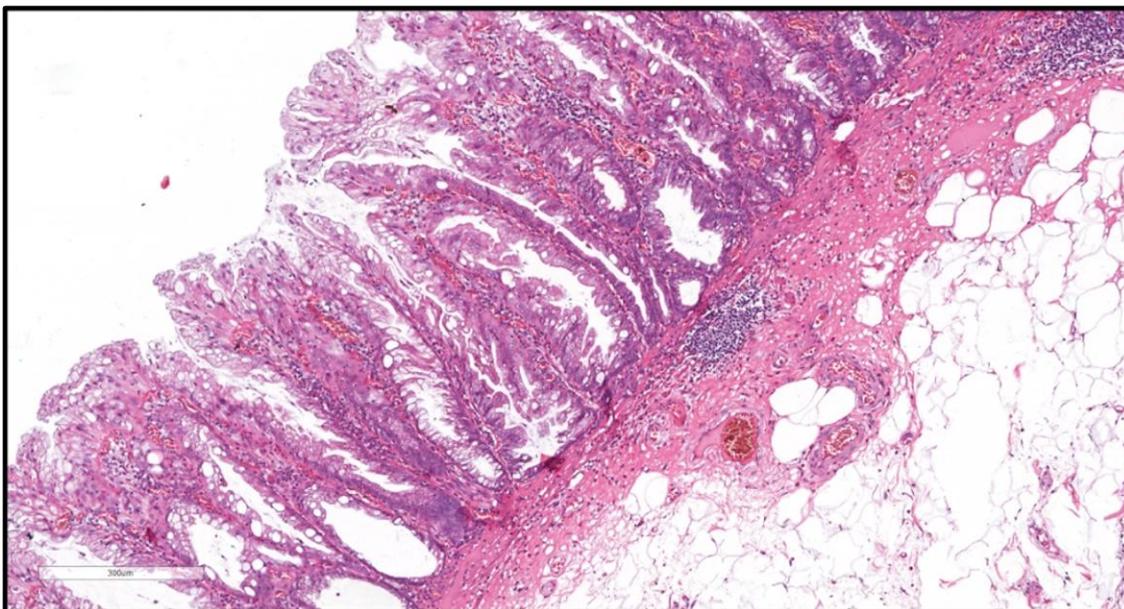


Figura 6: Lesão serrilhada séssil. Observa-se serrilhamento em toda extensão de criptas, que mostram marcada irregularidade arquitetural e luzes dilatadas em suas bases. Hematoxilina e Eosina (100 X / 300  $\mu$ m).

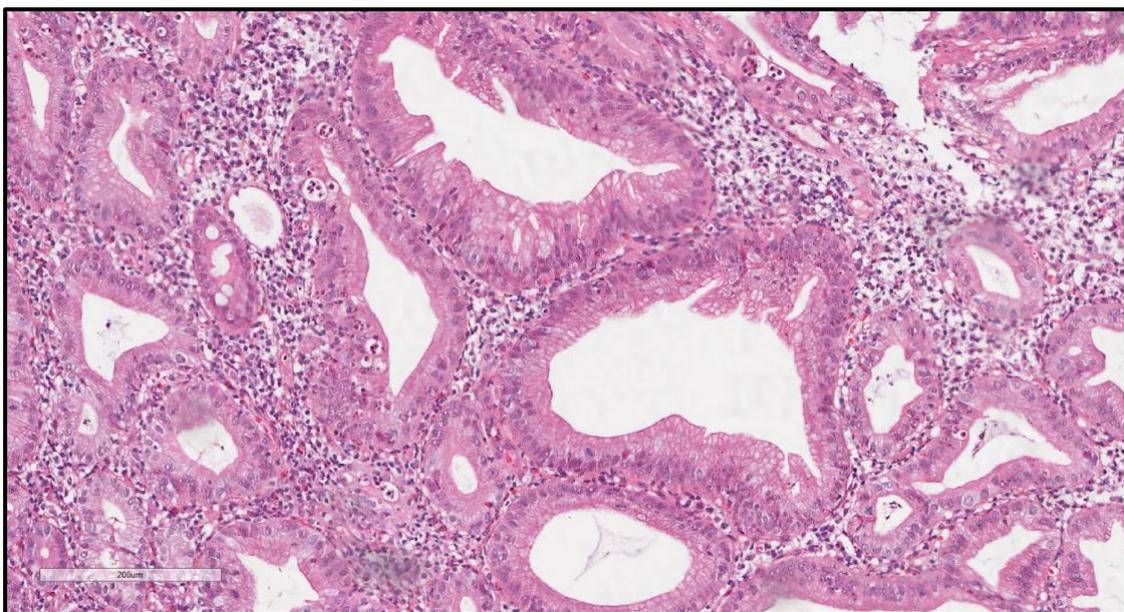


Figura 7: Lesão serrilhada séssil com displasia serrilhada, caracterizada por citoplasma eosinofílico, núcleos redondos e com cromatina mais clara. Hematoxilina e Eosina (400 X / 200  $\mu\text{m}$ ).



Figura 8: Adenoma serrilhado tradicional. Lesão caracterizada pela formação de projeções viliformes, serrilhamento “em fendas” e eosinofilia citoplasmática. No recorte circular, à direita, é possível ver estas duas últimas características em maior detalhe. Hematoxilina e Eosina (100 X / 700  $\mu\text{m}$ ).

### 5.1.2 Distribuição dos casos por idade, sexo e topografia e a correlação com os diagnósticos da amostra.

A distribuição por idade variou entre 24 e 83 anos, tendo sido a média de 65,9 anos, com a mediana de 67 anos e desvio-padrão de 8,96. Dentre os casos analisados, a maioria dos casos, 116 (67,4%) situou-se na faixa entre 50 e 70 anos, 50 casos (29,1%) foram observados em pessoas acima de 70 anos e, somente 6 casos (3,5%) em indivíduos com menos de 50 anos. Foi observada uma variação na média de idade de 63,31 até 67,83 anos (pólipo hiperplásico e adenoma serrilhado tradicional;  $p=0,018$ ), conforme a tabela 2. Já, quando separadas por faixas etárias de até 50 anos, entre 50 e 70 e acima de 70 anos, foi observado para todas as lesões que a faixa entre 50 e 70 anos abrigava a maior parte dos casos (67,4% dos casos;  $p = 0,016$ ).

Tabela 2: Correlação entre a média e mediana das idades observadas (variável contínua) e os diagnósticos.

Idade	Idade X Diagnósticos			
	Pólipo Hiperplásico	Lesão Serrilhada Sésil	Adenoma Serrilhado Tradicional	Adenoma Convencional
Média	63,31 (CI: 60,42 - 66,20)	64,85 (CI: 62,21 - 67,49)	67,83 (CI: 63,99 - 71,67)	67,92 (CI: 65,77 - 70,07)
Mediana	63,5	63	68,5	69
Desvio padrão	9,26	9,09	7,73	8,61
Total	42 (24,4 %)	48 (27,9 %)	18 (10,5%)	18 (10,5%)

*Teste de Kruskal Wallis  $p=0,018$*

Com relação à distribuição dos casos por sexo, 47,7% (82) da amostra era de pacientes do sexo masculino e 52,3% (90) do sexo feminino.

A distribuição dos diagnósticos em relação ao sexo mostrou um predomínio de casos no sexo feminino, quando relacionado aos diagnósticos de pólipo hiperplásico (52,4%) e lesão serrilhada sésil (62,5%), porém a diferença não se mostrou significativa ( $p=0,298$ ).

A localização de maior frequência das lesões foi em cólon sigmoide (26,2%), seguida de cólon ascendente (22,1%), cólon descendente (19,2%), reto (15,1%), cólon transversal (12,2%) e ceco (5,2%).

Considerando os segmentos intestinais do ceco, cólon ascendente e transversal como cólon direito e, cólon descendente, sigmoide e reto como cólon

esquerdo, a distribuição dos casos se dá em, aproximadamente, 60% dos casos (104) no cólon esquerdo e, 40% no cólon direito (68).

Ainda em relação à topografia, identificou-se maior frequência de localização das lesões em cólon esquerdo (60,5%), porém, em relação às lesões acometendo cólon direito observou-se predominância dos adenomas convencionais (59,4%) e das lesões serrilhadas sésseis (50,0%), diferença bem expressiva em relação aos pólipos hiperplásicos (9,5%) e adenomas serrilhados tradicionais (39,5%), estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

As correlações entre variáveis clínico-epidemiológicas (sexo, idade e topografia) encontram-se descritas na tabela 3, abaixo:

Tabela 3. Correlação entre variáveis clínico-epidemiológicas e diagnósticos.

Variável	Categoria	PH		LSS		AST		AC		<i>p</i> valor <sup>a</sup>
		n	%	N	%	n	%	n	%	
Sexo	Masculino	20	47,6	18	37,5	11	61,1	33	51,5	0,298
	Feminino	22	52,4	30	62,5	7	38,9	31	48,5	
Idade	Abaixo 50 anos	2	4,8	1	2,1	1	5,6	2	3,1	0,016
	Entre 50 a 70 anos	34	81	37	77,1	9	50	36	56,3	
	Acima de 70 anos	6	14,3	10	20,8	8	44,4	26	40,6	
Topografia	Cólon direito	4	9,5	24	50	2	11,1	38	59,4	< 0,0001
	Cólon esquerdo	38	90,5	24	50	16	88,9	26	40,6	

PH – Pólipo hiperplásico; LSS – Lesão serrilhada sésseis; AST – Adenoma Serrilhado Tradicional e AC – Adenoma Convencional. <sup>a</sup> Teste Exato de Fisher

## 5.2 FREQUÊNCIA E CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS MORFOLÓGICAS.

Neste tópico serão descritas as frequências das principais variáveis morfológicas (citológicas, arquiteturas e imuno-histoquímicas) e a correlação com os diagnósticos da amostra.

### 5.2.1 Variáveis citológicas e arquiteturas e correlação com o diagnóstico.

A grande maioria das lesões estudadas (69,8%) não apresentou qualquer evidência de irregularidade de cripta, porém quando presente, foi identificada em pelo menos três criptas, em 22,1% da amostra. As figuras 9 e 10, abaixo, ilustram exemplos considerados, pelos 03 pesquisadores, em consenso, como “irregularidade arquitetural inequívoca”.

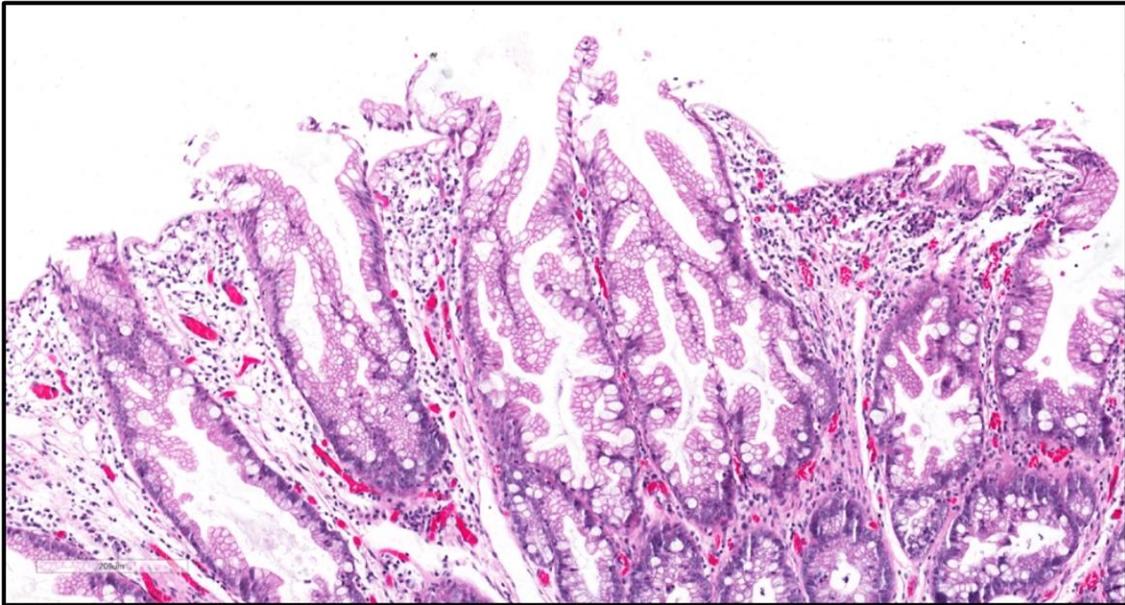


Figura 9: Serrilhamento luminal. Observamos tortuosidade de criptas com luzes serrilhadas em toda a sua extensão. Hematoxilina e Eosina (200 X / 200  $\mu$ m).

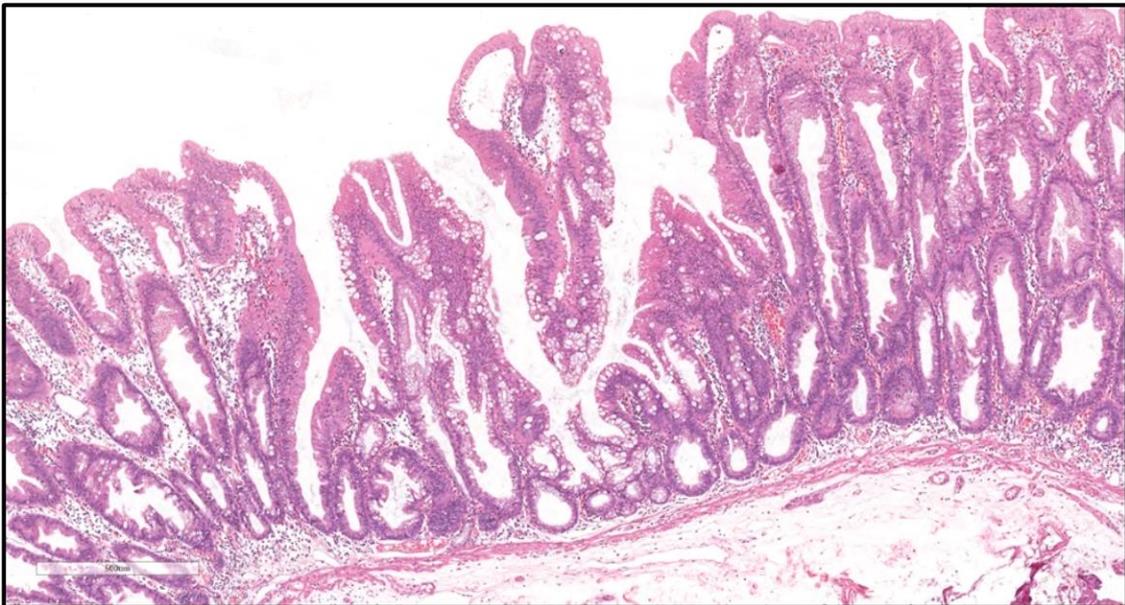


Figura 10: Irregularidade de criptas. Presença de numerosas criptas de tamanhos e formatos diferentes entre si. Hematoxilina e Eosina (100 X / 500  $\mu$ m).

Os maiores percentuais identificados, dentro de cada variável analisada foram: serrilhamento luminal proximal (29,7%), irregularidade acima de 03 criptas (22,1%), prolongamento horizontal (15,2%) e dilatação da base (13,4%). Demais frequências das variáveis categóricas morfológicas estudadas, encontram-se dispostas na tabela 4, abaixo e, exemplificadas nas figuras 11 a 17.

Tabela 4: Distribuição das variáveis morfológicas na amostra.

Variável	Categoria	n	%
<b>Irregularidade de Cripta</b>	Nenhuma	120	69,8
	Uma cripta	6	3,5
	2 a 3 criptas	8	4,7
	Acima de 03 criptas	38	22,1
<b>Dilatação da Base</b>	Ausente	140	81,4
	Discreto	9	5,2
	Frequente	23	13,4
<b>Prolongamento horizontal</b>	Ausente	146	84,9
	Discreto	13	7,6
	Frequente	13	7,6
<b>Serrilhamento Luminal</b>	Ausente	60	34,9
	Proximal	51	29,7
	Distal / Completo	42	24,4
	Fendiforme ("Slit Like")	19	11,0
<b>Herniação Submucosa</b>	Ausente	166	96,5
	Presente	6	3,5
<b>Tipo Celular Predominante</b>	Microvesicular	88	51,2
	Caliciforme	84	48,8
<b>Estratificação Nuclear</b>	Ausente	89	51,7
	Presente	83	48,3
<b>Arquitetura Vilosa</b>	Ausente	134	77,9
	Focal	8	4,7
	Frequente	30	17,4
<b>"Crowding"</b>	Ausente	95	55,2
	Presente	77	44,8
<b>Eosinofilia Citoplasmática</b>	Ausente	153	89,0
	Presente	19	11,0
<b>Núcleos "Pencilados"</b>	Ausente	151	87,8
	Presente	21	12,2
<b>Criptas Ectópicas</b>	Ausente	154	89,5
	Presente	18	10,5
<b>Displasia</b>	Negativo para displasia	81	47,1
	Displasia convencional	82	47,7
	Displasia serrilhada	9	5,2

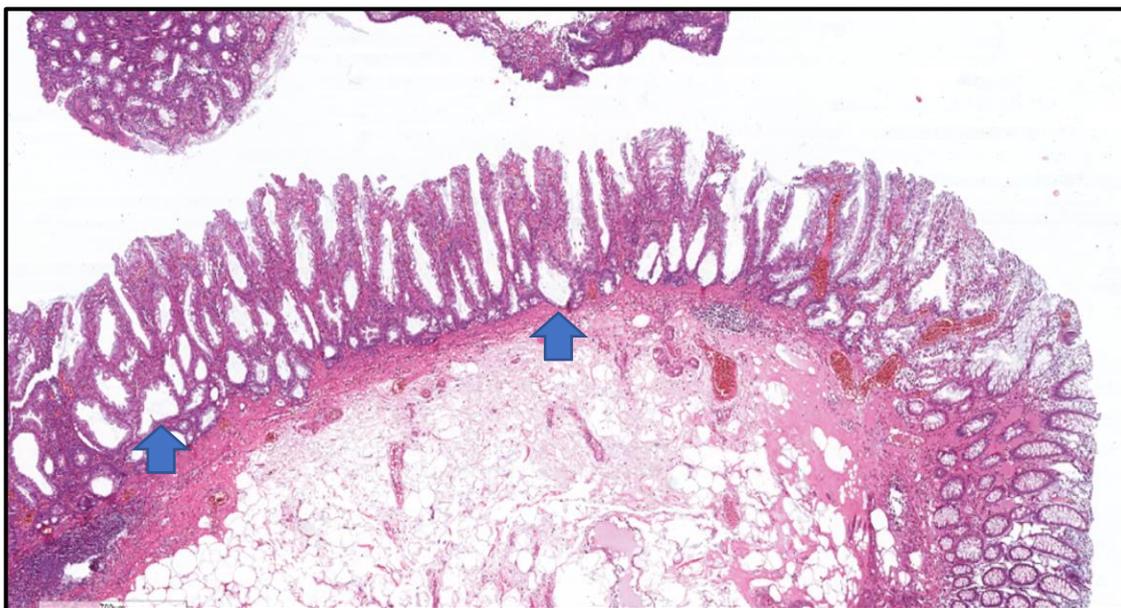


Figura 11: Dilatação das bases das criptas. Observam-se criptas com dilatação de suas luzes, em toda sua extensão, principalmente em suas bases – setas azuis (HE/ 40X / 700 $\mu$ m).

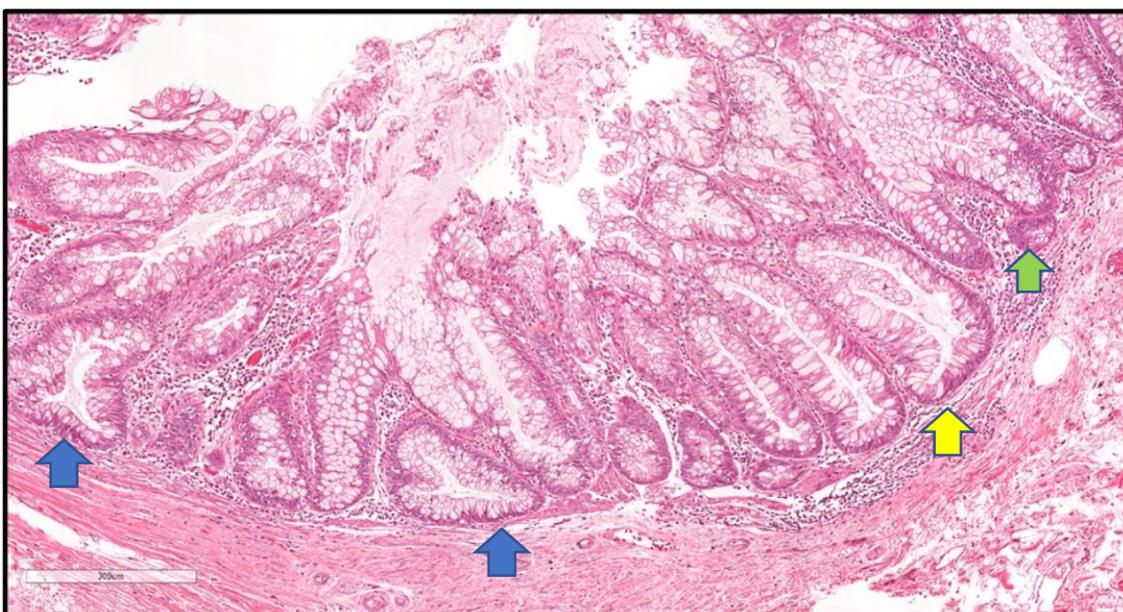


Figura 12: Prolongamento horizontal. Observam-se criptas com irregularidade arquitetural, mostrando prolongamento lateral de suas luzes de diferentes formas. As setas azuis mostram um padrão que se assemelha a uma letra “T” invertida, enquanto a seta amarela mostra um padrão em “J” ou “em bota”. A seta verde resalta uma bifurcação da base da cripta (HE/ 400X / 300 $\mu$ m).

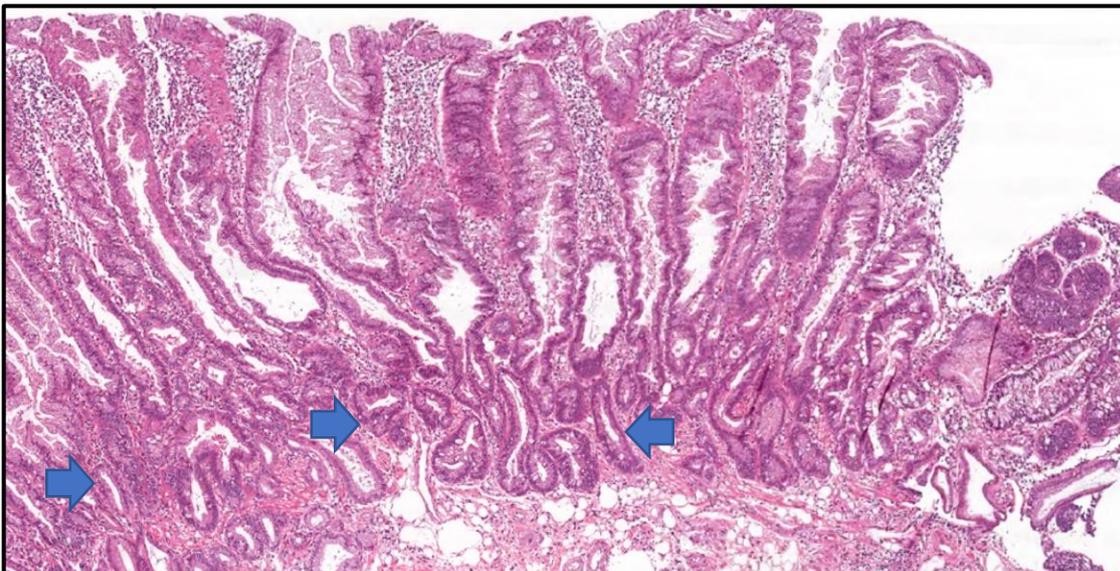


Figura 13: Herniação submucosa. A figura mostra áreas onde a terminação das criptas irregulares, com serrilhamento em toda sua extensão, se insinuam por entre as fibras da muscular da mucosa (HE/ 400X / 300 $\mu$ m).

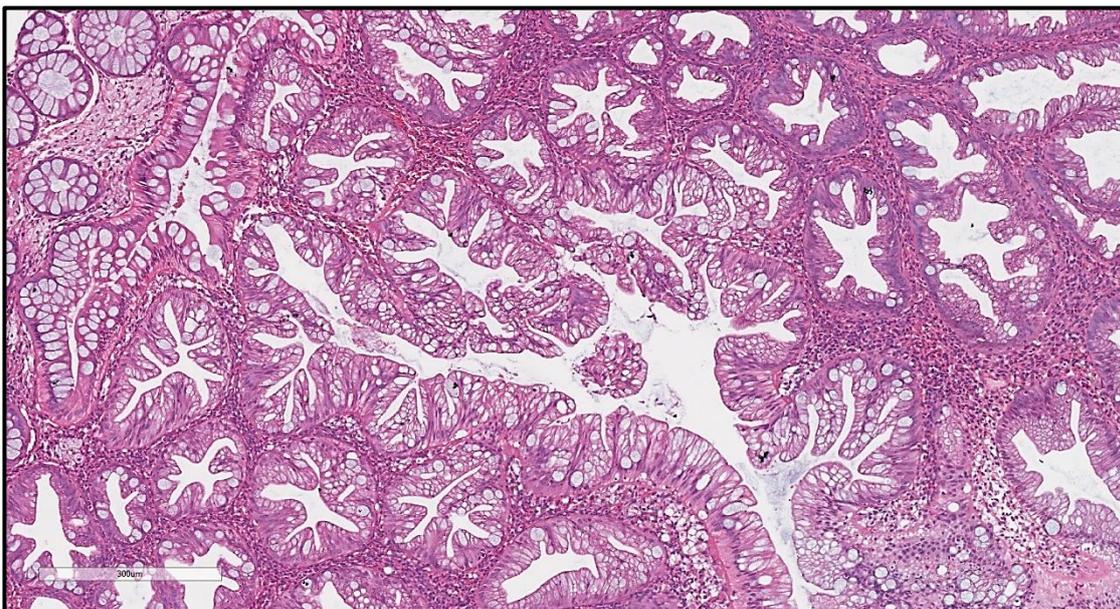


Figura 14: Serrilhamento luminal proeminente, com predominância de células do tipo microvesicular (contendo microvesículas de mucina). As glândulas possuem também marcante irregularidade de seus contornos (HE/ 200X / 300 $\mu$ m).

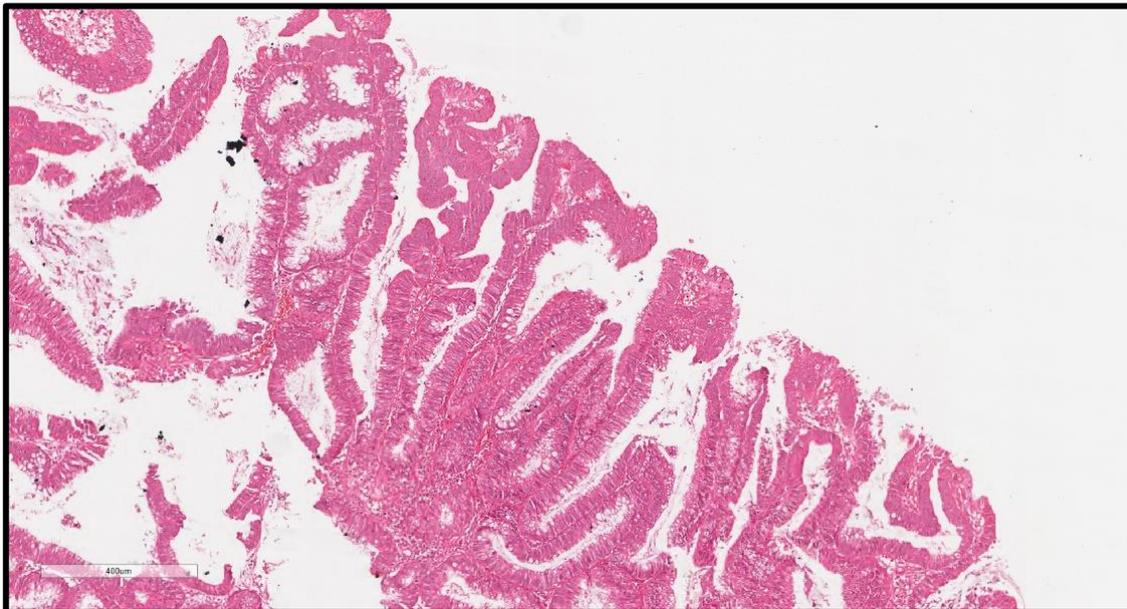


Figura 15: Glândulas exibindo arquitetura vilosa, em adenoma túbulo-viloso, convencional. É possível observar neste aumento, a característica de arquitetura vilosa relacionada à formação de projeções digitiformes da mucosa, às quais denominamos vilosidades e é uma condição comum em adenomas convencionais túbulo-vilosos e vilosos, além de adenomas serrilhados tradicionais (HE/ 100X / 400µm).

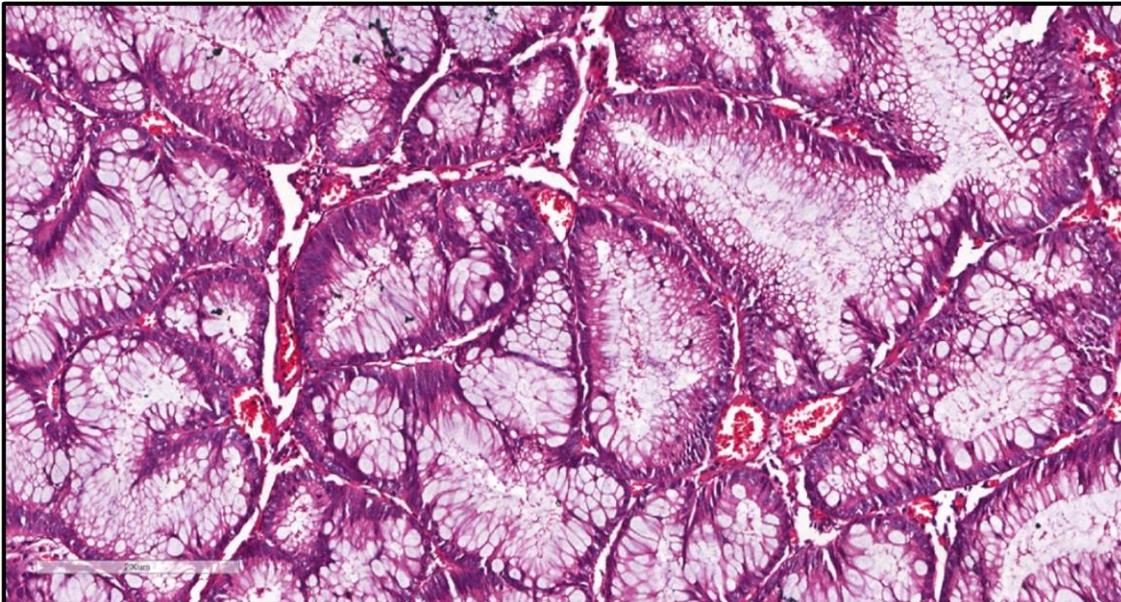


Figura 16: "Crowding" ou sobreposição glandular em adenoma convencional. Glândulas mostrando a característica que denominamos como "crowding" ou sobreposição, que representa a proximidade entre elas, com escasso córion interglandular, além de núcleos pseudoestratificados. (HE/ 200X / 200µm).

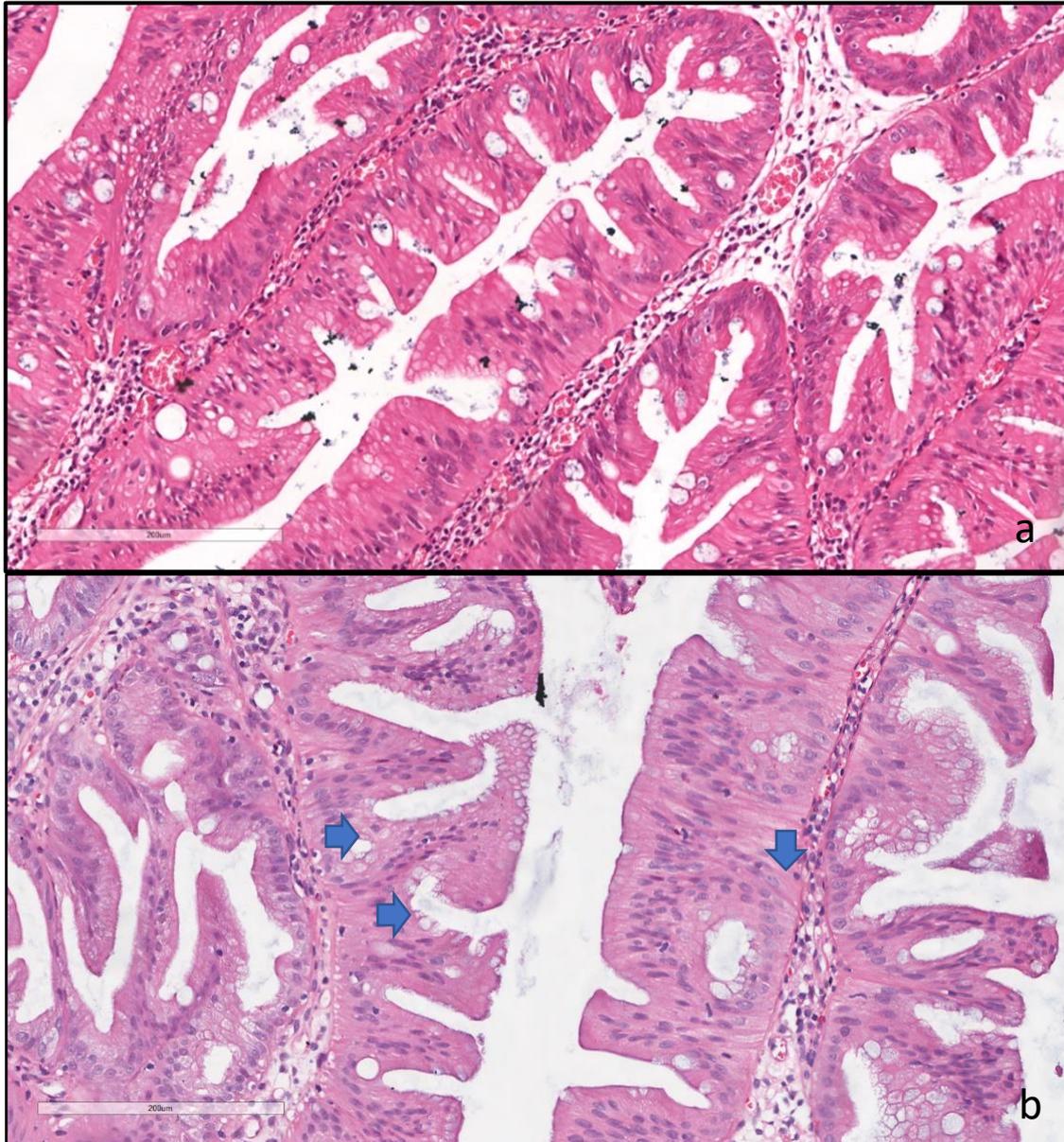


Figura 17: (A) Núcleos “pencilados” ou alongados. Observa-se também, neste aumento, o padrão de serrilhamento fendiforme característico dos adenomas serrilhados tradicionais, além de eosinofilia citoplasmática. (HE/ 400X / 200 $\mu$ m). (B) Criptas ectópicas de pequeno tamanho, não ancoradas à membrana basal, como se estivessem formando microcriptas. (HE/ 400X / 200 $\mu$ m).

Com relação à displasia, quase metade dos casos não apresentou displasia (47,1%) ou apresentou displasia do tipo convencional (47,7%); displasia serrilhada foi identificada em apenas 5,2% dos casos. Uma melhor descrição sobre as características de cada tipo de displasia será realizada adiante. As figuras 18 e 19 mostram exemplos de displasia convencional e serrilhada.

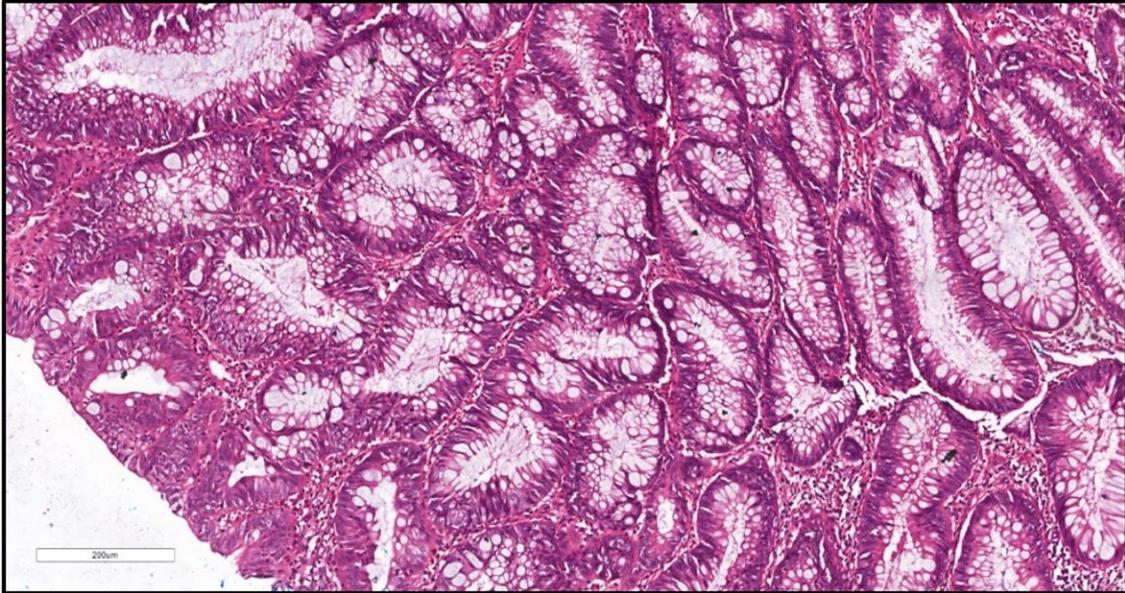


Figura 18: Displasia do tipo convencional. Observa-se pseudoestratificação e hiper cromasia nuclear. Hematoxilina e Eosina. (100 X / 200  $\mu$ m).

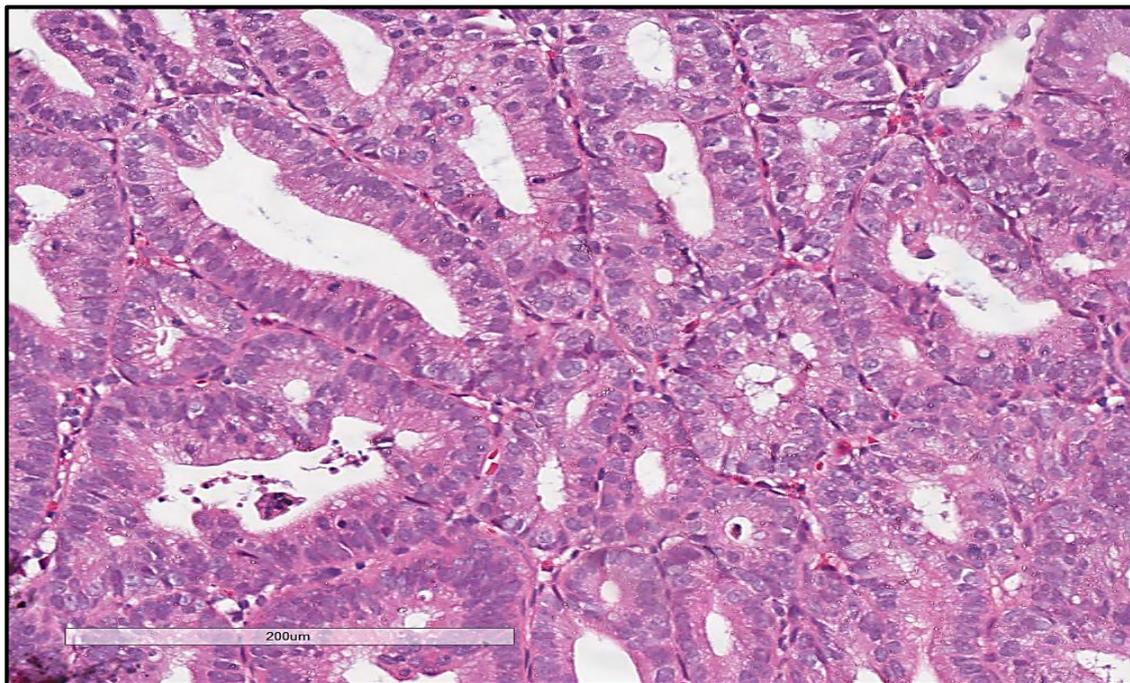


Figura 19: Displasia do tipo serrilhada. Caracteriza-se por eosinofilia citoplasmática e núcleos arredondados com cromatina mais clara, em relação à displasia convencional. Hematoxilina e Eosina (400 X / 200  $\mu$ m).

As variáveis morfológicas estudadas, conforme descrito anteriormente em materiais e métodos, foram divididas em 03 grupos, sendo o grupo 1, composto por aquelas mais relacionadas às lesões serrilhadas sésseis e pólipos hiperplásicos; o grupo 2 pelas características próprias de adenomas serrilhados

tradicionais e o grupo 3, por aquelas mais relacionadas aos adenomas convencionais. Todas foram correlacionadas com os diagnósticos para que se pudesse observar se havia diferença estatisticamente significativa em sua frequência nos casos estudados. As características morfológicas aqui abordadas foram melhor descritas anteriormente, principalmente entre as páginas 43 a 53. Optaremos por utilizar esta divisão de maneira a estratificar melhor os dados analisados.

5.2.2.1 grupo I. Variáveis morfológicas mais relacionadas às lesões serrilhadas sésseis e pólipos hiperplásicos (dilatação da base, irregularidade de cripta, herniação submucosa, prolongamento horizontal, serrilhamento luminal, tipo celular predominante).

Os achados com relação a estas variáveis encontram-se na tabela 5.

Tabela 5: Correlação entre variáveis clínico-epidemiológicas usuais em pólipos hiperplásicos e lesões serrilhadas sésseis (grupo I) e diagnóstico.

Variável	Categoria	PH		LSS		AST		AC		<i>p</i> valor <sup>a</sup>
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Dilatação da Base	Ausente	41	97,6	21	43,8	16	88,9	62	96,9	< 0,0001
	Discreto	1	2,4	8	16,7	0	0	0	0	
	Frequente	0	0	19	39,6	2	11,1	2	3,1	
Irregularidade de Cripta	Nenhuma	40	95,2	2	4,2	17	94,4	61	95,3	< 0,0001
	Uma cripta	1	2,4	5	10,4	0	0	0	0	
	2 a 3 criptas	1	2,4	7	14,6	0	0	0	0	
	Acima de 03 criptas	0	0	34	70,8	1	5,6	3	4,7	
Herniação Submucosa	Ausente	42	100	42	87,5	18	100	64	100	< 0,0001
	Presente	0	0	6	12,5	0	0	0	0	
Prolongamento horizontal	Ausente	42	100	26	54,2	16	88,9	62	96,9	< 0,0001
	Discreto	0	0	10	20,8	1	5,6	2	3,1	
	Frequente	0	0	12	25	1	5,6	0	0	
Serrilhamento luminal	Ausente	0	0	0	0	0	0	60	93,8	< 0,0001
	Proximal	42	100	8	16,7	0	0	1	1,6	
	Distal	0	0	40	81,3	0	0	3	4,7	
	"Slit like"	0	0	0	0	18	100	0	0	
Tipo celular predominante	Microvesicular	40	95,2	48	100	0	0	0	0	< 0,0001
	Caliciforme	2	4,8	0	0	18	100	64	100	

PH - pólipo hiperplásico; LSS - lesão serrilhada sésil; AC – adenoma convencional; AST - adenoma serrilhado tradicional. <sup>a</sup> Teste Exato de Fisher.

É importante ressaltar que algumas variáveis apresentaram padrões de distribuição bem distintos, como por exemplo a dilatação da base; esta foi uma característica quase não observada em outras lesões que não as lesões serrilhadas sésseis e, esteve presente nestas seja de forma discreta (16,7%) ou frequente (39,6%), tendo sido pouco frequente nos PH e AST.

Fato semelhante foi observado com a característica irregularidade de cripta, aqui interpretada como padrão de “tortuosidade, crescimento assimétrico, alteração da zona proliferativa” da cripta, observado em uma, duas, três ou mais criptas. Nas outras lesões, tal alteração quase não foi observada (95,2%) ou até mesmo foi ausente (94,4%), enquanto na LSS foi encontrada em 70,8% dos casos, comprometendo mais de “3 criptas”.

Duas observações importantes devem ser feitas:

1. A observação de irregularidade de uma a três criptas correspondeu a cerca de 25% dos casos; e

2. Embora existam marcantes irregularidades arquiteturais em AST, estas não foram consideradas sob esta denominação e sim, em separado, por tratar-se de características muito específicas e não as tradicionalmente descritas para LSS, como veremos mais à frente <sup>(53)</sup>.

Herniação submucosa e prolongamento horizontal foram características observadas quase que exclusivamente em LSS embora, mesmo neste grupo, não tenha sido identificada com grande frequência, as quais estiveram presentes em 12,5% e 45,8% dos casos de LSS, respectivamente.

As características serrilhamento luminal e tipo celular predominante apresentaram distribuições de acordo com diagnóstico, como por exemplo, o tipo celular microvesicular esteve presente em 95,2% e 100% dos PH e LSS, respectivamente, enquanto 100% dos AC apresentaram células caliciformes como o tipo celular observado. Por sua vez, o padrão de serrilhamento luminal proximal foi observado em 100% dos PH, serrilhamento distal (ou completo) em 81,3% das LSS e o padrão “slit like” ou fendiforme em 100% dos AST; aproximadamente 93,8% dos AC não apresentou a característica de serrilhamento luminal.

A distribuição da correlação entre diagnósticos e este grupo de características morfológicas mostrou-se significativa ( $p < 0,0001$ ).

5.2.2.2 grupo II. Variáveis morfológicas mais comumente observadas nos adenomas convencionais (estratificação nuclear, displasia, “crowding” e arquitetura vilosa).

Os achados com relação a estas variáveis encontram-se listados na tabela 6.

Tabela 6: Correlação entre variáveis clínico-epidemiológicas usuais em adenomas convencionais (grupo II) e diagnóstico.

Variável	Categoria	PH		LSS		AST		AC		<i>P</i> valor <sup>a</sup>
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Estratificação nuclear	Ausente	42	100	38	79,2	9	50	0	0	< 0,0001
	Presente	0	0	10	20,8	9	50	64	100	
Displasia	Ausente	42	100	38	79,2	1	5,6	0	0	< 0,0001
	Convencional	0	0	9	18,7	9	50	64	100	
	Serrilhada	0	0	1	2,1	8	44,4	0	0	
"Crowding"	Ausente	42	100	41	85,4	10	55,6	2	3,1	< 0,0001
	Presente	0	0	7	14,6	8	44,4	62	96,9	
Arquitetura vilosa	Ausente	42	100	44	91,7	1	5,6	47	73,4	< 0,0001
	Focal	0	0	0	0	1	5,6	7	10,9	
	Frequente	0	0	4	8,3	16	88,9	10	15,6	

PH - pólipio hiperplásico; LSS - lesão serrilhada séssil; AC – adenoma convencional; AST - adenoma serrilhado tradicional. <sup>a</sup> Teste Exato de Fisher

As variáveis deste grupo não foram observadas em pólipos hiperplásicos, porém encontravam-se presente na quase totalidade ou maioria dos adenomas convencionais, com exceção da característica “arquitetura vilosa”, que foi mais frequente em adenomas serrilhados tradicionais (88,9 %), seguida de adenomas convencionais (26,4%) (p < 0,0001).

5.2.2.3 grupo III. Variáveis morfológicas próprias de adenomas serrilhados tradicionais (eosinofilia citoplasmática, núcleos alongados ou “pencilados” e criptas ectópicas)

. Estas variáveis foram mais frequentemente observadas em adenomas serrilhados tradicionais. A distribuição observada foi considerada significativa (p<0,0001) e encontra-se na tabela 7.

Tabela 7: Correlação entre variáveis clínico-epidemiológicas usuais em adenomas serrilhados tradicionais (grupo III) e diagnóstico.

Variável	Categoria	PH		LSS		AST		AC		<i>p</i> valor <sup>a</sup>
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Eosinofilia citoplasmática	Ausente	42	100	47	97,9	1	5,6	63	98,4	< <b>0,0001</b>
	Presente	0	0	1	2,1	17	94,4	1	1,6	
Núcleos “pencilados”	Ausente	42	100	46	95,8	0	0	63	98,4	< <b>0,0001</b>
	Presente	0	0	2	4,2	18	100	1	1,6	
Criptas ectópicas	Ausente	42	100	47	97,9	1	5,6	64	100	< <b>0,0001</b>
	Presente	0	0	1	2,1	17	94,4	0	0	

PH - pólipo hiperplásico; LSS - lesão serrilhada séssil; AC – adenoma convencional; AST - adenoma serrilhado tradicional. <sup>a</sup> Teste Exato de Fisher

### 5.3 FREQUÊNCIA E CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS IMUNO-HISTOQUÍMICAS COM O DIAGNÓSTICO

#### 5.3.1 Frequência e Correlação das Variáveis Imuno-histoquímicas.

A expressão do BRAF foi analisada de duas formas; inicialmente atribuiu-se uma categorização de acordo com a intensidade de marcação citoplasmática definidas como fraca, moderada e forte, tendo 61,6% dos casos negativos e, a maior parte dos casos exibindo marcação fraca (27,3%).

Como a maior parte das amostras exibiu marcação fraca, os casos foram agrupados como resultados positivos, independente da intensidade. Com isso, o total de casos positivos passou a corresponder a 38,4% da amostra. As figuras 20 e 21 ilustram exemplos de pólipos serrilhados positivos para BRAF, em seus diferentes padrões de expressão, conforme a intensidade.

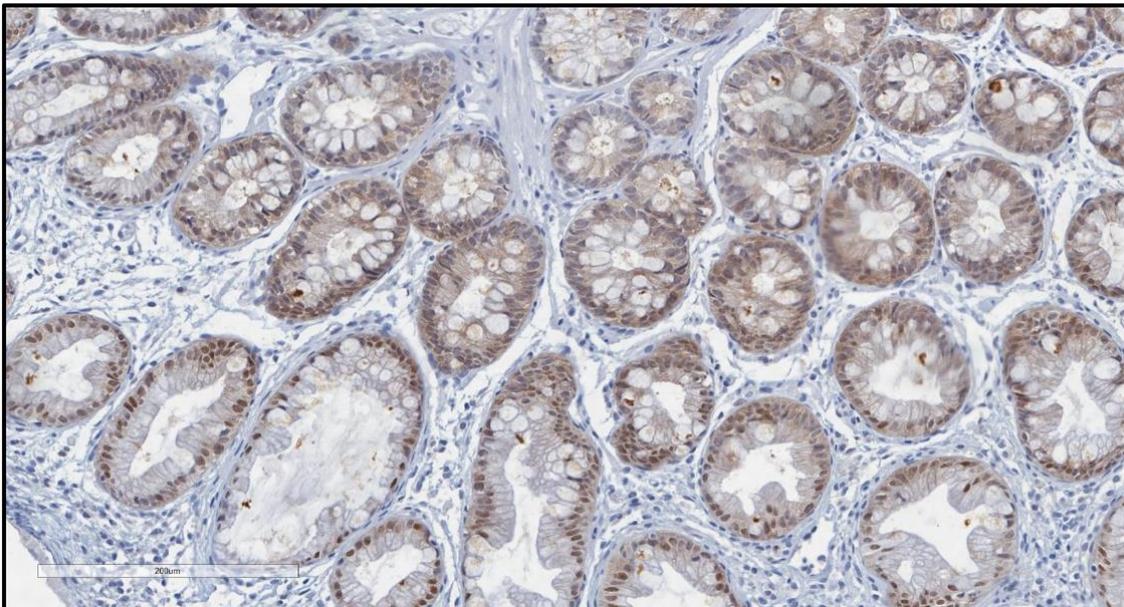


Figura 20: Padrões de expressão do marcador BRAF. Positividade citoplasmática fraca. Observa-se ainda positividade nuclear, inespecífica. (400X / 200µm).

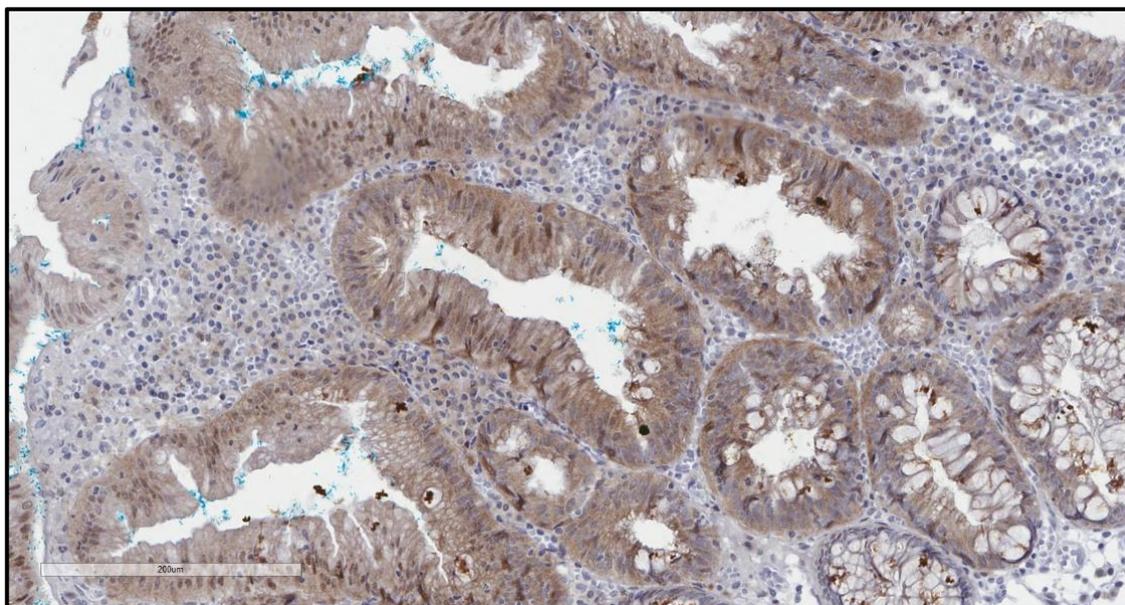


Figura 21: Padrões de expressão do marcador BRAF. Positividade citoplasmática forte. Observa-se ainda marcação nuclear inespecífica. (400X / 200µm).

A expressão do marcador Anexina A10 foi analisada considerando como positiva, lesão com mais de 5% de positividade citoplasmática e nuclear <sup>(49)</sup>, e os casos separados em negativos ou até 5%, expressão entre 6 e 50% e acima de 50% de positividade; destes, 45,3% dos casos foram positivos, com 16,3% dos casos exibindo positividade acima de 50%. As figuras 22 e 23 mostram casos positivos para este marcador, com expressão entre 6 e 50% e acima de 50%.

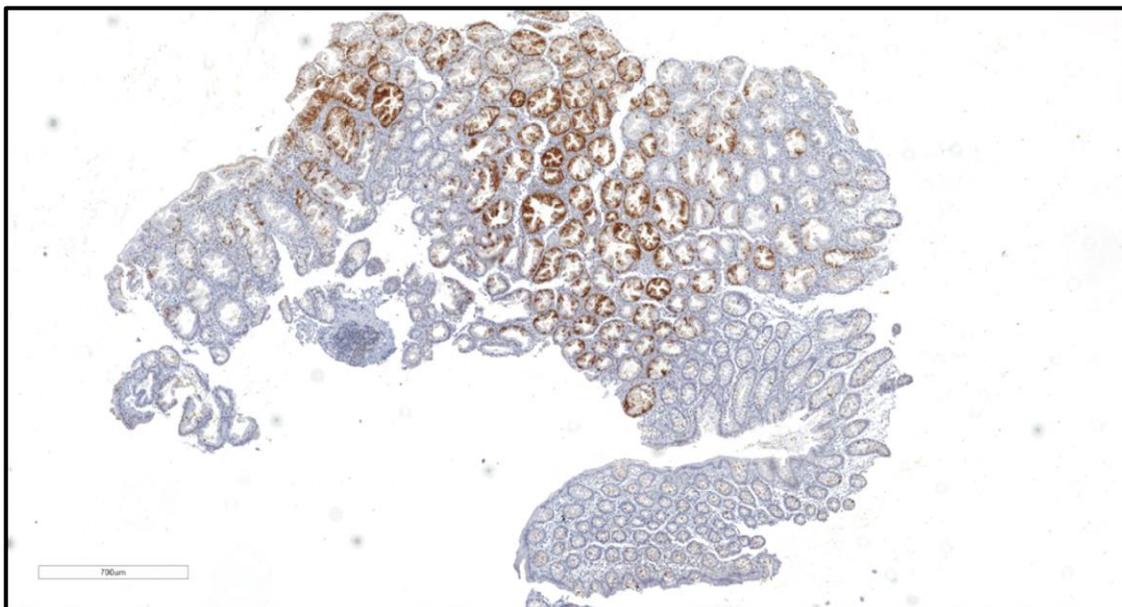


Figura 22: Padrões de expressão do marcador Anexina A10. Positividade em cerca de 6 a 50% das glândulas (40X / 700µm).

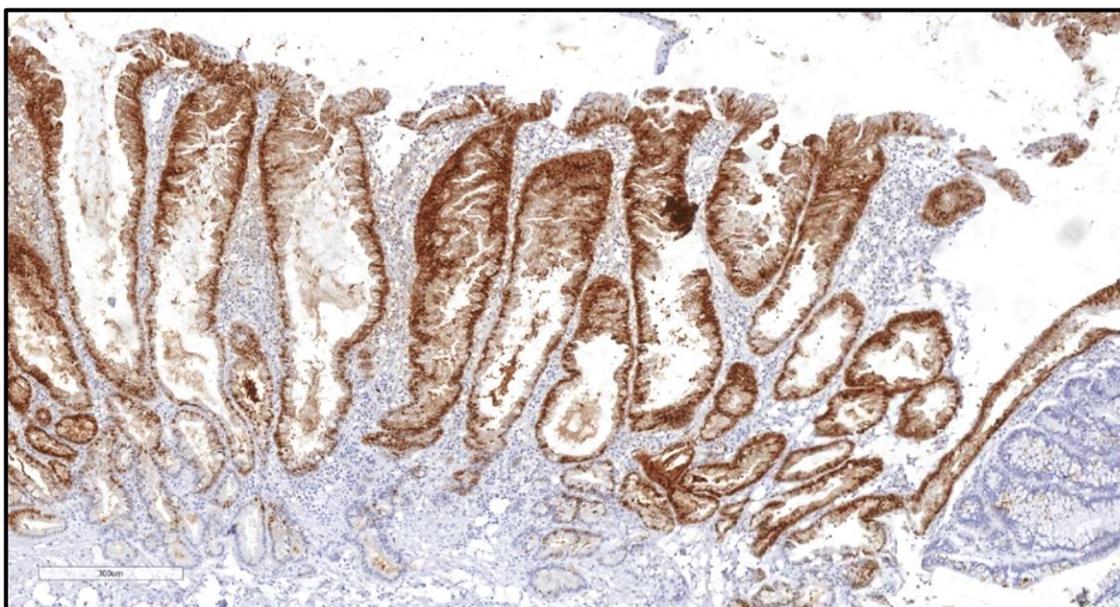


Figura 23: Padrões de expressão do marcador Anexina A10. Positividade nuclear e citoplasmática, acima de 50% (200X / 300µm).

A análise do marcador Ki-67 mostrou o seguinte perfil de expressão: 28,5% (49) exibiram positividade basal; 23,8% (41) marcação irregular; 41,3% (71), marcação focal e, 6,4% (11), marcação em criptas ectópicas. As figuras 24 a 27 exemplificam estes perfis de expressão.

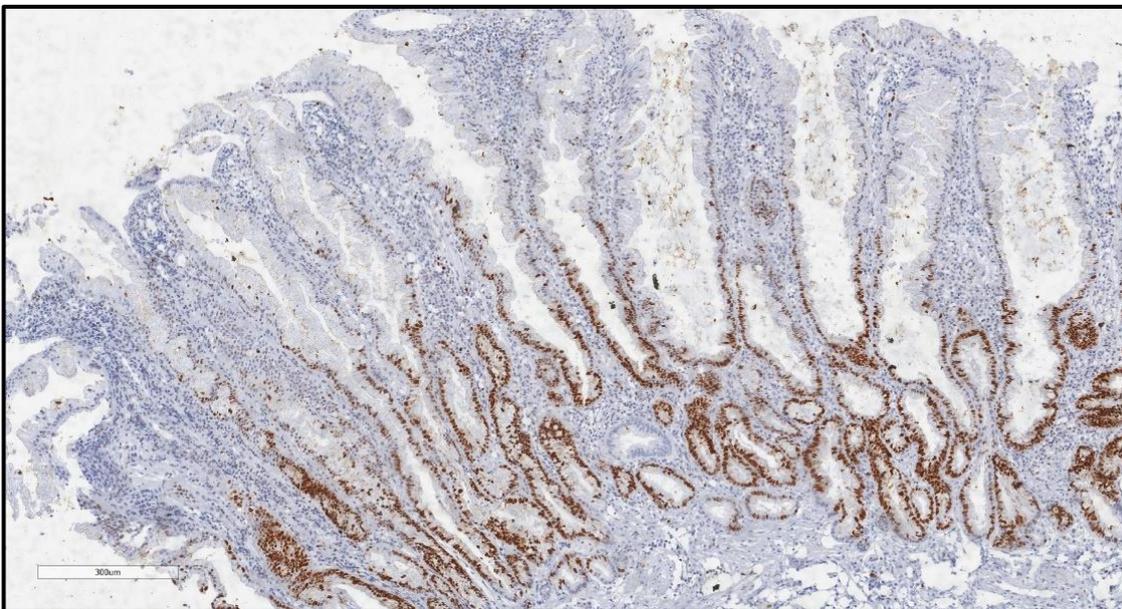


Figura 24: Padrões de expressão do Ki-67. Positividade restrita à porção basal das criptas. Este padrão é comumente observado em pólipos hiperplásicos e demarca a zona de atividade proliferativa da cripta (100X / 300µm).

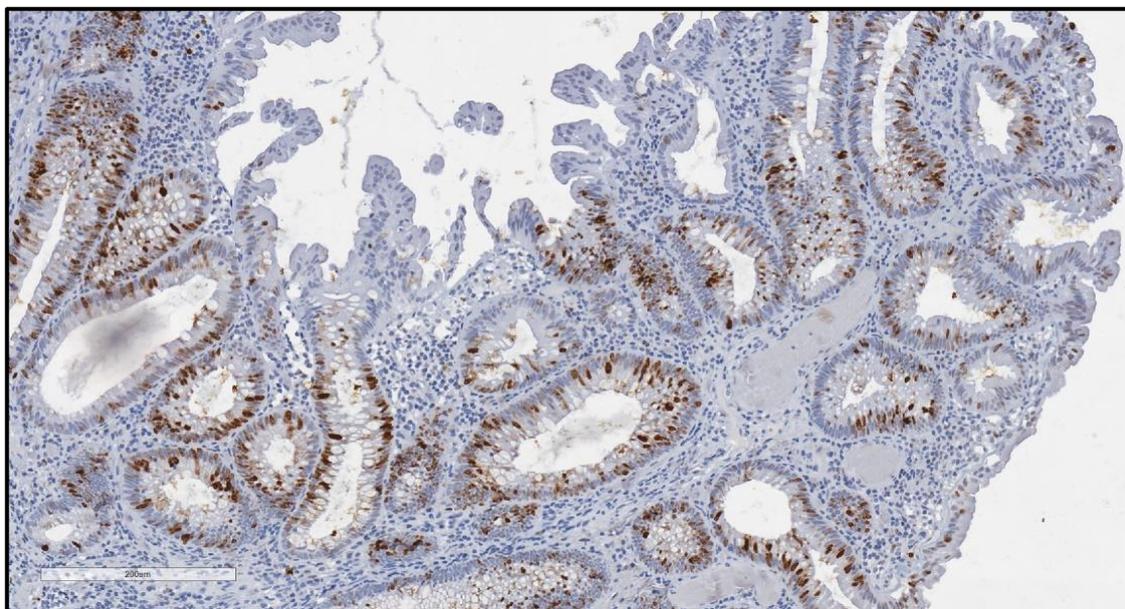


Figura 25: Padrões de expressão do Ki-67. Positividade irregular. Este padrão é comumente observado em lesões serrilhadas sésseis e denota o deslocamento da zona de atividade proliferativa da cripta para porções mais proximais da cripta nestas lesões (200X / 200µm).

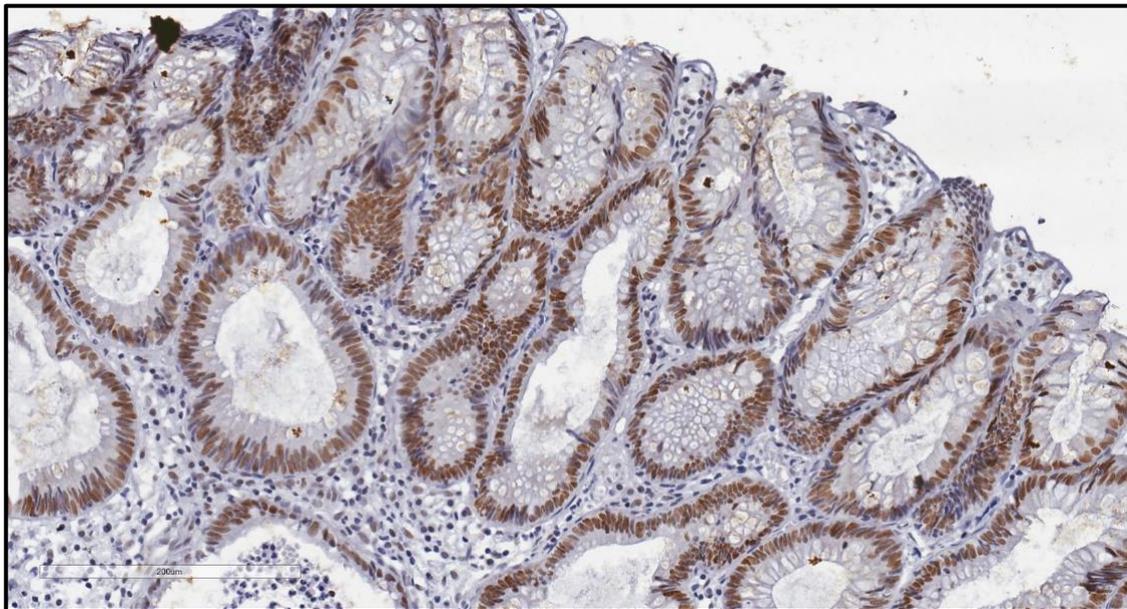


Figura 26: Padrões de expressão do Ki-67. Positividade difusa. Este é o padrão observado em adenomas convencionais, refletindo o aumento da atividade proliferativa em toda a cripta e, relacionada à displasia que se observa nos núcleos das glândulas (200X / 200 $\mu$ m).

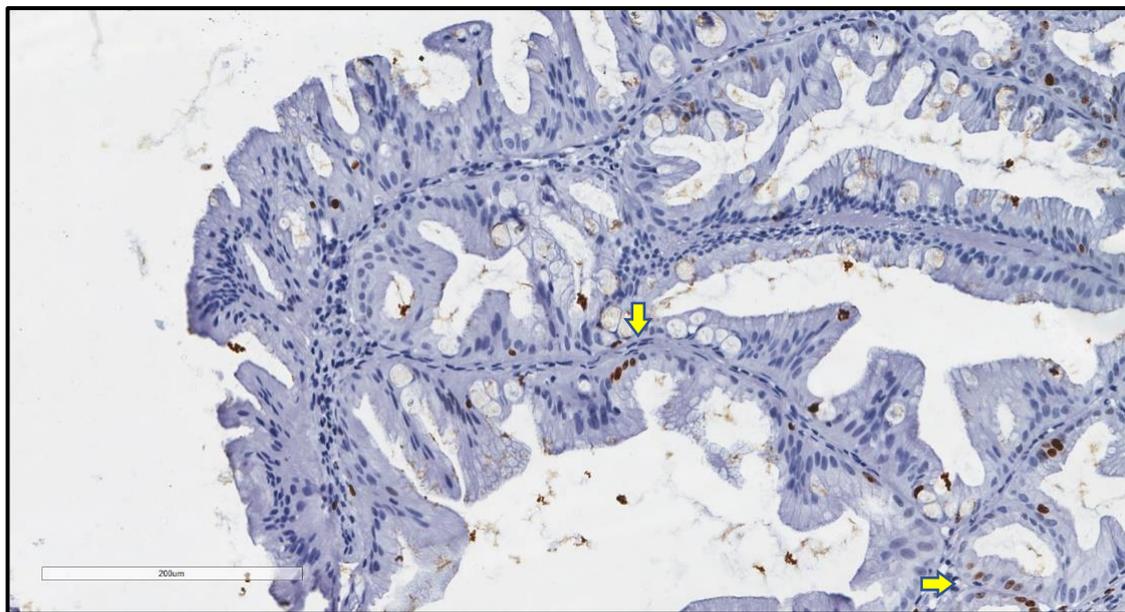


Figura 27: Padrões de expressão do Ki-67. Positividade focal e esparsa, sobretudo em criptas ectópicas, padrão comumente observado em adenomas serrilhados tradicionais. As setas ressaltam as áreas positivas (200 X / 200 $\mu$ m).

A expressão de MUC-1 pelas diferentes lesões estudadas foi também avaliada em nosso trabalho. A maioria das amostras foram negativas 94,2% (162), com apenas 1,7% (3) focalmente positivas para o marcador e 4,1% (7) dos casos exibiu positividade difusa.

A análise imuno-histoquímica do MLH-1 demonstrou manutenção da expressão da marcação (positividade difusa), em 93% (160) dos casos, enquanto em 7% (12) dos casos, observou-se perda focal de expressão, denotando baixa probabilidade de padrão de instabilidade microssatélite na casuística estudada. A tabela 8 abaixo contém a distribuição com relação à expressão dos marcadores.

Tabela 8: Distribuição das variáveis imuno-histoquímicas na amostra.

Variável	Categoria	n	%
<b>BRAF (positivo ou negativo)</b>	Negativo	106	61,6
	Positivo	66	38,4
<b>BRAF (intensidade de marcação)</b>	Negativo	106	61,6
	Fraco	47	27,3
	Moderado	17	9,9
	Forte	2	1,2
<b>Anexina A (03 categorias)</b>	Negativo a 5%	94	54,7
	6 a 50%	50	29,1
	Acima de 50%	28	16,3
<b>MUC-1</b>	Negativo	162	94,2
	Positivo focal	3	1,7
	Positivo difuso	7	4,1
<b>Ki-67</b>	Basal	49	28,5
	Irregular	41	23,8
	Difuso	71	41,3
	Criptas Ectópicas	11	6,4
<b>MLH-1</b>	Perda focal	12	7,0
	Positivo difuso	160	93,0

### 5.3.2 Correlação das Variáveis Imuno-histoquímicas com o Diagnóstico.

#### 5.3.2.1 BRAF e Anexina A10.

Em relação à expressão de BRAF, a maioria dos casos mostrou-se negativa (106 – 61,6%) para o marcador, entretanto alguns padrões foram mais característicos. Dentre eles, 100% dos adenomas convencionais foram

negativos para o BRAF; além disso, entre os diagnósticos de pólipo hiperplásico e lesão serrilhada séssil, ambos apresentaram expressão para BRAF, com padrão de expressão fraca predominante, porém enquanto 57,1% dos pólipos hiperplásicos foi positivo para o marcador, foi observado algum padrão de positividade para o BRAF em 79,2% das LSS. Apenas 22,2% dos AST expressaram alguma positividade.

Por sua vez, a expressão de Anexina A10 apresentou padrões de marcação mais característicos; não houve nenhum caso de adenoma convencional positivo para o marcador, assim como não houve nenhum caso de PH com positividade acima de 50%, tendo este tipo de lesão expressado positividade entre 6 e 50% em 54,8% dos casos. Por outro lado, apenas 10,4% das LSS foram negativas para o marcador e 50% das LSS mostraram positividade acima de 50%. Dentre os AST, 66,6% das lesões mostraram algum grau de expressão, a maioria (44,4%) entre 6 e 50%.

Tanto a análise considerando 04 categorias (negativo, fraco, moderado e acentuado), e 02 categorias (positivo ou negativo) para o BRAF, quanto para as 03 categorias de Anexina A10, mostraram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ); o restante da distribuição encontra-se na tabela 9.

Tabela 9: Correlação entre a expressão de BRAF e Anexina A10 e os diagnósticos.

Variável	Categoria	PH		LSS		AST		AC		<i>p</i> valor <sup>a</sup>
		n	%	n	%	n	%	n	%	
BRAF (04 categorias)	Negativo	18	42,9	10	20,8	14	77,8	64	100	<b>&lt; 0,0001</b>
	Fraco	16	38,1	28	58,3	3	16,7	0	0	
	Moderado	8	19	9	18,8	0	0	0	0	
	Forte	0	0	1	2,1	1	5,6	0	0	
BRAF (02 categorias)	Negativo	18	42,9	10	20,8	14	77,8	64	100	<b>&lt; 0,0001</b>
	Positivo	24	57,1	38	79,2	4	22,2	0	0	
Anexina A10 (03 categorias)	Negativo (até 5%)	19	45,2	5	10,4	6	33,3	64	100	<b>&lt; 0,0001</b>
	Entre 6 e 50 %	23	54,8	19	39,6	8	44,4	0	0	
	Acima de 50 %	0	0	24	50	4	22,2	0	0	

PH - pólipo hiperplásico; LSS - lesão serrilhada séssil; AC – adenoma convencional; AST - adenoma serrilhado tradicional. <sup>a</sup> Teste Exato de Fisher

De acordo com o objetivo específico de construção de um escore com capacidade de aplicação diagnóstica, optou-se por analisar como se comportavam os dados quando analisados apenas dentro do grupo das lesões da via serrilhada (pólipos hiperplásicos, lesões serrilhadas sésseis e adenomas serrilhados tradicionais), totalizando 108 lesões. Historicamente, desde a descrição dos pólipos serrilhados, o tipo de lesão que costuma oferecer maior dificuldade diagnóstica, bem como possui maior número de critérios diagnósticos, inclusive modificados ao longo das 03 últimas décadas, é o das lesões serrilhadas sésseis. Desta forma, procedeu-se a análise da correlação destes marcadores entre dois conjuntos agrupados (lesão serrilhada séssil e não-lesão serrilhada séssil, este último compreendendo os pólipos hiperplásicos e adenoma serrilhados tradicionais da amostra), visando a construção de um modelo de regressão logística binária.

Quando agrupados apenas os pólipos serrilhados e analisando-se a distribuição a partir do diagnóstico de lesão serrilhada séssil ou não-lesão serrilhada séssil (não LSS), observou-se uma pequena diferença na expressão de BRAF no grupo das não LSS (53,3 vs. 46,7% de casos positivos), contudo com acentuação da diferença no grupo das LSS, alcançando 79,2% de casos positivos ( $p=0,001$ ). Já a expressão de Anexina A10, quando se agrupam os diagnósticos, é negativa em 41,7% dos casos de não LSS, contra apenas 10,4% ( $p<0,0001$ ). A tabela 10 mostra esta distribuição.

Tabela 10: Correlação entre a expressão de BRAF e Anexina A10 entre os pólipos serrilhados.

Variável	Categoria	Não LSS		LSS		Total		<i>p valor</i> <sup>a</sup>
		n	%	n	%	n	%	
BRAF	Negativo	32	53,3	10	20,8	42	38,9	<b>0,001</b>
	Positivo	28	46,7	38	79,2	66	61,1	
Anexina A10	Negativo até 5%	25	41,7	5	10,4	30	27,8	<b>&lt; 0,0001</b>
	Entre 6 e 50%	31	51,7	19	39,6	50	46,3	
	Acima de 50%	4	6,7	24	50	28	25,9	
<b>Total</b>		60	55,5	48	44,5	108	100	

LSS - lesão serrilhada séssil. <sup>a</sup> Teste Exato de Fisher

### 5.3.2.2 Ki-67, MUC-1 e MLH-1.

A expressão do Ki-67 em correlação com os diagnósticos apresentou praticamente um padrão para cada um dos diagnósticos. Nos PH 95,2% exibiu positividade na porção basal das criptas, 100% dos AC exibiram positividade difusa e, as LSS e os AST apresentaram padrão mais disperso, com marcação irregular em 77,1% das LSS e, focal e em criptas ectópicas em 61,1% dos AST. As distribuições apresentadas foram estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

A expressão de MUC-1, embora estatisticamente significativa ( $p < 0,0002$ ), mostrou escassa positividade, em 16,7% das LSS, sendo negativa no restante.

Na amostra estudada não identificamos nenhum caso com perda total da expressão de MLH-1 (portanto todos foram positivos, com baixa probabilidade de fenótipo *MSI-high* pelo estudo imuno-histoquímico), com apenas 03 casos de perda focal da expressão (02 LSS e 01 AST), não significativa ( $p = 0,107$ ); como existe descrição na literatura <sup>(44)</sup> de relação entre a perda de expressão de MLH-1 (ainda que focal) e o surgimento de displasia, foi analisada esta correlação. De todo modo, apenas 03 casos de lesões com displasia apresentaram perda focal de expressão do MLH-1, sem significância estatística ( $p = 0,248$ ). O restante da distribuição encontra-se na tabela 11.

Tabela 11: Correlação entre a expressão de Ki-67 e MUC-1 com diagnósticos e MLH-1, com diagnósticos e displasia.

Variável	Categoria	PH		LSS		AC		AST		Sem displasia		Com displasia		<i>p</i> valor <sup>a</sup>
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Ki-67	Basal	40	95,2	9	18,8	0	0	0	0					< 0,0001
	Irregular	1	2,4	37	77,1	0	0	3	16,7					
	Difuso	1	2,4	2	4,2	64	100	4	22,2					
	Criptas Ectópicas	0	0	0	0	0	0	11	61,1					
MUC-1	Negativo	41	97,6	40	83,3	64	100	17	94,4					< 0,0002
	Positivo Focal	1	2,4	2	4,2	0	0	0	0					
	Positivo Difuso	0	0	6	12,5	0	0	1	5,6					
MLH-1	Perda focal	0	0	2	4,2	0	0	1	5,6	0	0	3	3,3	0,107 <sup>b</sup>
	Positivo Difuso	42	100	46	95,8	64	100	17	94,4	81	100	88	97	0,248 <sup>c</sup>

PH - pólipos hiperplásicos; LSS - lesão serrilhada séssil; AC - adenoma convencional; AST - adenoma serrilhado tradicional. <sup>a</sup> Teste Exato de Fisher <sup>b</sup> valor p MLH-1 x diagnósticos <sup>c</sup> valor p MLH1 x displasia.

#### 5.4 REGRESSÃO LOGÍSTICA E ELABORAÇÃO DE ESCORE DIAGNÓSTICO.

Após a avaliação das variáveis cuja correlação com o diagnóstico apresentou diferença significativa, estas foram analisadas entre si, para se testar em um modelo de regressão logística, quais destas atribuiriam maior chance de predição dos diagnósticos das lesões estudadas (análise multivariada). Após a aplicação de diferentes modelos, com inclusões e retiradas de variáveis (*stepwise*), o melhor modelo obtido para a criação do escore proposto foi aquele que manteve apenas as variáveis topografia (localização da lesão) e a expressão dos marcadores BRAF e Anexina A10, visando o diagnóstico de Lesões Serrilhadas Sésseis (não LSS x LSS), utilizando-se um modelo de regressão logística binária.

As distribuições das demais variáveis analisadas clínico-epidemiológicas, morfológicas e imuno-histoquímica não apresentaram qualidades estatísticas suficientes para permanecerem no modelo de regressão logística, gerando erros nos resultados após a inserção das mesmas, seja por se apresentarem muito relacionadas a um tipo específico de diagnóstico ou por apresentarem baixa frequência de apresentação, como foi o caso de alguns marcadores como o MLH-1 e MUC-1. Maiores considerações sobre a limitação das variáveis não aproveitadas para a elaboração do escore serão feitas no tópico Discussão.

Os valores obtidos de coeficiente beta representaram a magnitude da associação e, a proporcionalidade entre os seus diferentes valores para todas as variáveis incluídas no modelo, foi utilizado como valor de base para a elaboração do escore.

Por fim, foram calculados os valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de Lesões Serrilhadas Sésseis, com a utilização da curva ROC, considerando um intervalo de confiança de 95% e valor de  $p < 0,05$ , e tendo como pontos de corte para definir um caso como positivo ou negativo, a pontuação com base no escore proposto, apresentado pelas lesões estudadas.

#### 5.4.1 Regressão Logística Binária e Escore Diagnóstico.

A análise pelo método da regressão logística possibilitou estimar a “chance” de cada variável estar associada ao diagnóstico de uma Lesão Serrilhada Sésil. Desta forma, com base nos valores de OR (*Odds Ratio*), seria possível inferir que a localização de uma lesão em cólon direito confira 9,6 “mais chances” ( $p = 0,0005$ ; IC 95% - 2,7 a 34,5) de se tratar de uma LSS, enquanto a positividade para o Anexina A10 acima de 50%, corresponda a 24,2 “vezes”, o risco do diagnóstico ser uma LSS ( $p = 0,0002$ ; IC 95% - 4,6 a 126,2).

Da mesma maneira, o parâmetro beta ( $\beta$ ) nos permite inferir uma proporcionalidade entre estes resultados; o menor resultado é o valor para a variável Anexina A10 de 0,76 que, em comparação com o valor para a variável BRAF (1,61), aproxima-se do dobro deste valor, correspondendo então em escore a 2 x o valor da variável mais baixa, portanto 2. Desta forma, os valores das unidades para a elaboração de um escore simples para as variáveis foram: localização em cólon direito (3), BRAF positivo (2), Anexina A10 entre 6 a 50% (1) e Anexina A10 acima de 50% (4). A tabela 12 mostra o restante dos resultados obtidos pela regressão logística.

Tabela 12: Modelo de regressão logística baseado nas variáveis adequadas.

Variáveis	Parâmetro ( $\beta$ )	Escore	Erro padrão	Wald	p	OR	I. C. para O. R. (95%)	
							Inferior	Superior
Cólon direito	2,26	<b>3</b>	0,6529	11,993	0,0005	<b>9,6</b>	2,7	34,5
BRAF positivo	1,61	<b>2</b>	0,5847	7,5512	0,0060	<b>5,0</b>	1,6	15,7
Anexina A10 entre 6 a 50%	0,76	<b>1</b>	0,6440	1,3745	0,0241	<b>2,1</b>	0,6	7,5
Anexina A10 acima de 50%	3,19	<b>4</b>	0,8431	14,275	0,0002	<b>24,2</b>	4,6	126,2

A adequação do modelo ajustado foi avaliada pelo Teste de Hosmer-Lemeshow que mostrou ser possível, com este modelo, predizer 75,9% dos diagnósticos, cujas amostras de pólipos serrilhados exibiram a seguinte distribuição após aplicação do escore simplificado, conforme a tabela 13 abaixo.

Tabela 13: Aplicação do teste de *Hosmer-Lemeshow* para avaliação do modelo de regressão logística.

Observado	Predito		
	Não LSS	LSS	Percentual Correto (%)
Não LSS	105	23	83,3
Lesão Serrilhada Sésil	26	95	66,7
Percentual Global			75,9

LSS - lesão serrilhada sésil.

Uma vez atribuído um peso para cada uma das variáveis que mostraram qualidades estatísticas para o modelo de regressão logística, foi possível elaborar um escore simplificado utilizando-se a soma destas características presentes, seja com relação à localização da lesão ou em relação à expressão de BRAF e Anexina A10. Com base nos valores obtidos é possível obter-se valores de somatórios que vão de 0 a 9 e, a aplicação do escore proposto na amostra estudada, permite a estratificação das lesões, em correlação com o diagnóstico, conforme a tabela 14, abaixo.

Tabela 14: Distribuição dos pólipos serrilhados de acordo com a pontuação do escore.

Distribuição por escore	Não LSS	LSS	Total
0	16 (26,7%)	0	16(14,8%)
1	10(16,7%)	1(2,1%)	11(10,2%)
2	8(13,3%)	2(4,2%)	10(9,3%)
3	16(26,7%)	13(27,1%)	29(26,9%)
4	6(10,0%)	6(12,5%)	12(26,9%)
5	1(1,7%)	1(2,1%)	2(1,9%)
6	3(5,0%)	11(22,9%)	14(13,0%)
7	0(0,0%)	1(2,1%)	1(0,9%)
9	0(0,0%)	13(27,1%)	13(12,0%)
Total	60 (55,6%)	48 (44,4%)	108

% por diagnóstico

*Teste exato de Fisher p<0,0001*

LSS - lesão serrilhada sésil. Não LSS – Pólipos hiperplásicos e Adenomas Serrilhados Tradicionais (não lesões serrilhadas sésseis).

#### 5.4.2 Avaliação do Ponto de Corte e Acurácia do Escore Simplificado.

Por fim, para a determinação do melhor ponto de corte do escore proposto foi realizado o cálculo da curva ROC que identificou área sob a curva de 0,863, com significância estatística ( $p<0,0001$ ). A análise do gráfico produzido pela

curva ROC aponta que, para que um teste seja considerado com valores de sensibilidade e especificidade adequados, ele deve estar acima da linha de base (na cor verde) e, quanto mais próximo do quadrante superior esquerdo (ou mais próximo do valor de 1), maior serão a sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico proposto. A figura 28 mostra o gráfico relacionado ao escore proposto, quando aplicado à amostra estudada.

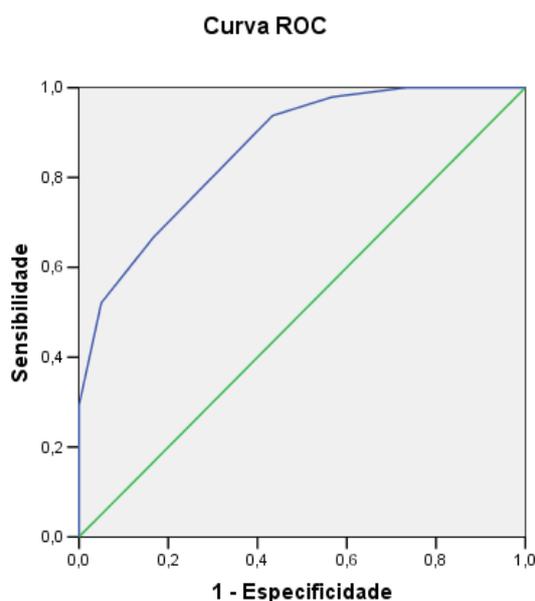


Figura 28: Análises da Curva ROC para cálculo de sensibilidade e especificidade.

Restava por fim definir, também a partir desta análise, os melhores valores de sensibilidade e especificidade dentro dos valores atribuídos no escore, tendo sido identificados os pontos de corte entre 3,5 (sensibilidade 67% e especificidade 83%) e 4,5 (sensibilidade 54% e especificidade 93%). Como não foi possível, com os valores obtidos, considerar casas decimais, o número inteiro entre estes dois valores seria o ponto de corte 4; o cálculo de sensibilidade e especificidade para este ponto de corte mostra sensibilidade de 66,7%, especificidade de 83,3% e acurácia de 75,9%.

A tabela 15 mostra os resultados da análise da curva ROC e das medidas de acurácia para o teste diagnóstico.

Tabela 15: Valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos para o diagnóstico de LSS com uso do escore proposto.

	Área sob a curva	Erro Padrão	p	IC 95%	
				Inferior	Superior
Escore	0,863	0,034	0,00000	0,797	0,929

Ponto de Corte - 4	%	Intervalos de Confiança (95%)
Sensibilidade	66.67%	(52.54 - 78.32)
Especificidade	83.33%	(71.97- 90.69)
Valor Preditivo Positivo	76.19%	(61.47 - 86.52)
Valor Preditivo Negativo	75.76%	(64.19 - 84.49)
Precisão de Diagnóstico	75.93%	(67.06 - 83.01)

<i>Cut-Offs</i>	Sensibilidade	Especificidade
0,5	100%	27%
1,5	98%	43%
2,5	94%	57%
3,5	67%	83%
4,5	54%	93%
5,5	52%	95%
6,5	29%	100%
8	27%	100%
10	0%	100%

## 6. DISCUSSÃO

Atualmente, o melhor conhecimento da via envolvida no desenvolvimento das lesões serrilhadas colorretais, assim como a definição das suas características morfológicas e uma nova classificação destas lesões serrilhadas intestinais, em geral, nos têm permitido entender e diagnosticar estas lesões com maior propriedade <sup>(53)</sup>.

Como já mencionado, a sua prevalência ainda é subestimada, visto que somente no início do atual século, a OMS descreveu os principais tipos de lesões serrilhadas. Desde então, em 2010 e 2019, novas lesões foram categorizadas como pertencentes a esta via, pela própria OMS. Conseqüentemente, a sua prevalência vem sendo subestimada.

Na amostra do presente estudo, as lesões serrilhadas sésseis corresponderam a 28%, das quais 6% eram LSS-CD, seguidas dos pólipos hiperplásicos (24%), e dos adenomas serrilhados tradicionais (10%), enquanto os adenomas convencionais corresponderam a 37%; dentre todos os diagnósticos, a frequência das LSS é a que mais se aproxima da observada na população geral. Embora a frequência das LSS que compõem este estudo seja similar à descrita por *Pai, RK e cols* <sup>(53)</sup> (10 a 30%, em relação a todos os pólipos colorretais - serrilhados e convencionais) e por *Sweetser S e cols* <sup>(56)</sup> (até 20% dos pólipos), como houve uma maior seleção de casos de pólipos serrilhados para a execução deste trabalho (já descrito na seção de materiais e métodos), nossos dados de frequência não podem ser comparados aos de outros estudos ou extrapolados para a população.

Da mesma forma, o perfil do nosso estudo não nos permite comparação com a literatura quanto à frequência dos AST, cujos relatos são próximos de 1%<sup>(56,59)</sup>, enquanto, em nossa amostra os AST corresponderam a 10%.

Em relação à distribuição por sexo e faixa etária, nosso estudo mostrou uma distribuição de idade que variou entre 24 e 83 anos, com média de 65,9 anos, mediana de 67 anos e desvio-padrão de 8,96.

*Batts K*<sup>(15)</sup> refere que as lesões da via serrilhada apresentam maior tendência de ocorrer em idades mais avançadas e em mulheres, principalmente em cólon proximal. *Benttington M*<sup>(75)</sup> refere, em sua casuística, identificação de pólipos hiperplásicos de 54% em homens e 46% em mulheres, enquanto para lesões serrilhadas sésseis, observa-se discreta predileção pelo sexo feminino (56%) em relação ao sexo masculino (44%). Em relação à idade, *Rosty e cols*<sup>(24)</sup>, acrescentam ainda que a identificação destas lesões pode estar relacionada à idade em que se inicia o rastreio colonoscópico de lesões colorretais, o que normalmente tem início acima dos 50 anos de idade. *East e cols*<sup>(5)</sup> também referem maior frequência na população acima de 50 anos ou entre 50 e 75 anos, em alguns estudos. *Haque e cols*<sup>(77)</sup> descreve idade média de 62 anos para o diagnóstico de LSS.

No presente estudo, separamos os indivíduos nas faixas etárias abaixo de 50 anos, entre 50 e 70 anos e acima de 70 e a distribuição encontrada foi de 3,5%, 67,4% e 29,1%, respectivamente, confirmando a ocorrência destas lesões em idades mais avançadas, particularmente a partir dos 50 anos, conforme descrito nos estudos acima referidos<sup>(5,15,75,77)</sup>. Estes dados, quando correlacionados com os diagnósticos mostrou predomínio de todos na faixa

etária entre 50 e 70 anos, principalmente entre as lesões serrilhadas sésseis (77,1%), estatisticamente significativa ( $p=0,016$ ).

Em relação à maior frequência na população feminina nosso resultado também acompanhou o descrito na literatura, conforme os estudos acima apresentados <sup>(5,15,75,77)</sup>, com 47,7% (82) da amostra em indivíduos do sexo masculino e 52,3% (90) do sexo feminino. Quando correlacionada, contudo, com os diagnósticos, essa distribuição não mostrou significância estatística ( $p = 0,298$ ).

Diversos autores referem a predileção de surgimento das lesões serrilhadas sésseis pela localização em cólon proximal <sup>(15,75,24,53)</sup>, com cerca de 70 a 80% das LSS surgindo em cólon proximal, enquanto 75 a 90% dos pólipos hiperplásicos e cerca de 70% dos adenomas serrilhados tradicionais ocorrem em cólon distal e reto <sup>(53)</sup>. *Rex e cols* <sup>(63)</sup> também descrevem frequências semelhantes de distribuição de pólipos serrilhados e, adicionalmente, referem que os adenomas convencionais podem ser identificados em todos os segmentos colônicos, com predileção das lesões planas ou sésseis pelo cólon proximal e das lesões pedunculadas pelo cólon distal.

Em nosso estudo a localização de maior frequência das lesões foi em cólon sigmoide (26,2%), seguida de cólon ascendente (22,1%). Considerando os segmentos colônicos como direito e esquerdo, 60% (104) dos casos localizava-se em cólon esquerdo e 40% (68) no cólon direito. Ao correlacionarmos a localização com o diagnóstico, observamos maior frequência de pólipos hiperplásicos e adenomas serrilhados tradicionais em cólon esquerdo ou distal (90,5% e 88,9%, respectivamente) e de adenomas convencionais pelo cólon direito ou proximal (59,4%), acompanhando os dados da literatura <sup>(53,63)</sup>. A

distribuição topográfica (localização) das lesões serrilhadas em relação aos diagnósticos mostrou-se estatisticamente significativa em nossa casuística ( $p < 0,0001$ ).

As lesões serrilhadas sésseis em nossa casuística apresentaram igual distribuição em cólons proximal e distal (50% cada), porém representando uma proporção bem maior de lesões em cólon proximal, quando comparados aos pólipos hiperplásicos e adenomas serrilhados tradicionais (9,5% e 11,1%, respectivamente), conforme descrito na literatura <sup>(53,55,59)</sup>.

*Makinen e cols* <sup>(60)</sup> descrevem que as LSS podem ser identificadas tanto em cólon distal como proximal, com leve predileção pelo cólon proximal. Ainda sobre este ponto, particularmente, acreditamos que possa haver alguma relação com a capacidade de identificação de lesões serrilhadas em cólon proximal, conforme *Sweetser e cols* <sup>(55)</sup> e *Haque e cols* <sup>(77)</sup>, que descrevem que a detecção por colonoscopia de lesões serrilhadas no cólon proximal são operador dependente, uma vez que elas se apresentam como lesões planas, recobertas por capa de muco, podendo passar facilmente despercebidas e negligenciadas em mais de 50% dos casos.

Ao longo das últimas décadas inúmeras características morfológicas e, posteriormente, imuno-histoquímicas e moleculares, vêm sendo agregadas para que se possa estabelecer o diagnóstico diferencial entre os pólipos serrilhados, uma vez que os estudos vêm delineando os prováveis caminhos moleculares dentro da via serrilhada e suas possibilidades de evolução para o surgimento de carcinomas colorretais.

*Bettington e cols*, *East e cols* e *Kim e cols* <sup>(5, 44,75)</sup>, dentre tantos outros autores propõem caminhos moleculares distintos para cada tipo de pólipo

colorretal e suas correlações com tipos histológicos e moleculares de carcinomas colorretais, como por exemplo, a proposta de que adenomas serrilhados tradicionais distais e adenomas túbulo-vilosos serrilhados seriam precursores dos carcinomas colorretais KRAS mutados, de pior prognóstico, assim como lesões serrilhadas sésseis, com instabilidade microssatélite relacionadas à metilação, CIMP+ e BRAF mutadas, seriam precursoras de carcinomas colorretais serrilhados e de melhor prognóstico. Na atualidade, as principais ferramentas que dispomos na rotina diária para diagnóstico são a avaliação das características morfológicas, o uso dos critérios definidos pela OMS <sup>(53)</sup> e, possivelmente, a utilização adicional de critérios clínicos, imuno-histoquímicos e moleculares.

No presente estudo foram analisadas a frequência de características morfológicas e suas correlações com os diagnósticos de pólipos serrilhados e de adenomas convencionais. Em relação às lesões serrilhadas sésseis, o serrilhamento luminal distal, seguido da irregularidade de 03 ou mais criptas e a dilatação frequente da base foram as características mais observadas (81,3%, 70,8% e 39,6%, respectivamente), semelhante ao descrito por *Rau e cols*<sup>(67)</sup> e *Ensari e cols*<sup>(66)</sup>, e esta distribuição mostrou significância estatística ( $p < 0,0001$ ). Inversamente, a presença de serrilhamento luminal proximal foi observado em 100% dos pólipos hiperplásicos e, em 95,2% destes não se observou irregularidade de criptas, conforme também descritos nos estudos anteriores <sup>(66,67)</sup>.

*Rau e cols*<sup>(67)</sup> demonstraram baixos níveis de concordância, para a identificação dos critérios morfológicos inversão e dilatação de criptas, formação de criptas ectópicas e citoplasma eosinofílico, contudo as características mais

identificadas para o diagnóstico de adenomas serrilhados sésseis (hoje definidas como LSS) foram prolongamento horizontal em “T” ou “L”, serrilhamento até a porção basal, dilatação e inversão de criptas. A presença de displasia convencional, tanto para lesões serrilhadas sésseis, quanto para adenomas convencionais, juntamente com pseudoestratificação nuclear e hiper cromasia foram as mais frequentemente observadas para este último diagnóstico, enquanto para o diagnóstico de adenoma serrilhado tradicional foi a formação de criptas ectópicas.

Chama a atenção que, apesar de apenas 10,4% das lesões serrilhadas sésseis terem apresentado irregularidade em apenas 01 cripta, conforme a nova classificação da OMS <sup>(53)</sup>. A inclusão desta categoria, juntamente com as lesões com 02 a 03 criptas, permitiriam identificar 95,8% das lesões da amostra (considerando-se como suficiente a presença de 01 cripta inequívoca como ponto de corte), o que provavelmente implicaria em um aumento substancial na sensibilidade para o diagnóstico. Estudos comparando o aumento na sensibilidade e especificidade para o diagnóstico com base nos novos critérios da OMS deverão ser realizados para que se possa fazer tal afirmação.

Em relação aos adenomas serrilhados tradicionais de nossa casuística, a presença de serrilhamento luminal fendiforme (“*slit like*”) e núcleos alongados (“*pencilados*”) foram observados em 100% dos AST, seguidas da presença de criptas ectópicas e eosinofilia citoplasmática (94,4%) cada, cuja distribuição mostrou-se estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ), semelhante ao observado nos estudos acima referidos <sup>(66,67)</sup>.

*Kim e cols* <sup>(44)</sup> contudo ressaltam que, conforme a nova edição da OMS <sup>(53)</sup>, o diagnóstico destas lesões baseado exclusivamente na presença de criptas

ectópicas, anteriormente consideradas patognomônicas do diagnóstico de AST, deve ser evitado, uma vez que elas podem ser também observadas em adenomas túbulo-vilosos, adenomas vilosos e adenomas túbulo-vilosos serrilhados.

Em nossa amostra, a característica “arquitetura vilosa”, foi mais frequente em adenomas serrilhados tradicionais (88,9 %), seguida de adenomas convencionais (26,4%) ( $p < 0,0001$ ). Embora este estudo possua uma seleção maior de AST, conforme já descrito na seção materiais e métodos, esta distribuição encontra-se de acordo com o descrito na literatura, uma vez que a maioria dos AST apresentam estas características e os adenomas convencionais, por sua vez, em sua maioria (cerca de 50 a 70%) são representados pelo tipo tubular, cuja característica é a exibição de menos de 25% de superfície vilosa em sua arquitetura<sup>(53)</sup>.

É expressiva, ainda, a observação de que os adenomas convencionais da amostra, expressam como principais características morfológicas a presença de estratificação nuclear, displasia e “crowding”, sendo identificadas em respectivamente 100%, 100% e 96,9% dos casos. Todavia, características mais comumente descritas em lesões serrilhadas<sup>(5,53)</sup>, como dilatação basal, irregularidade de cripta e serrilhamento luminal, foram identificadas, ainda que raramente, nos adenomas convencionais da amostra, correspondendo a 2%, 3% e 4% dos casos, respectivamente.

Com relação à expressão dos marcadores imuno-histoquímicos, no que concerne ao BRAF, os estudos referenciados em nosso trabalho, em sua maioria<sup>(32,33,78,79)</sup>, definiram como positiva, a marcação em qualquer intensidade no citoplasma, sem excluir a marcação fraca. *Boulagnon e cols*<sup>(30)</sup>, no entanto,

referem que a marcação com o BRAF pode ser heterogênea, principalmente com o uso de anticorpos monoclonais purificados de camundongos, em comparação com o uso de sobrenadante de hibridoma de anticorpos monoclonais de camundongos, que não apresentaram marcação fraca; neste estudo, o autor considerou como positivo apenas marcações com intensidade a partir de moderada, de modo a evitar falsos-positivos. De fato, em nossa amostra foi identificado um elevado percentual de casos com marcação fraca, e apenas 11,1% dos casos com marcação moderada ou forte, o que pode ser um fator que dificulte a concordância interobservador e reprodutibilidade, em relação a este marcador para as lesões serrilhadas.

Foi identificado que, em nossa amostra, 38,4% dos pólipos estudados apresentaram expressão citoplasmática para BRAF. Destes, 57,1% dos pólipos hiperplásicos e 79,2% das lesões serrilhadas sésseis foram positivas, enquanto nenhum dos adenomas convencionais exibiu expressão para este marcador e os AST exibiram positividade em somente 22,2% dos casos.

*Kokenek-Unal TD e cols* <sup>(85)</sup>, por exemplo, identificou em sua amostra, utilizando anticorpos anti-BRAF, positividade em 100% das LSS e 92,8% dos AST, enquanto apenas 37% dos PH mostraram positividade, de fraca intensidade, todos PHMV; estes resultados mostram um percentual maior de positividade para o BRAF em pólipos serrilhados, em comparação com os dados de nosso trabalho, com exceção apenas dos adenomas convencionais que se mostraram igualmente negativos, como em nossos casos.

Em nosso estudo, a maioria dos casos apresentou expressão fraca para o BRAF (27,3% dos casos e 58,3% das LSS, respectivamente). Por sua vez, embora *Kokenek-Unal TD e cols* <sup>(85)</sup> tenham demonstrado predomínio de

marcação moderada (48,78% dos casos, em relação à amostra e 66,66% das LSS), o percentual de casos com intensidade fraca mostrou valor próximo (36,58% dos casos), a maioria foi observada em PH (29,2% em relação à amostra).

*Mesteri e cols* <sup>(78)</sup> propuseram o uso da avaliação da expressão imunohistoquímica com o anticorpo anti-BRAF (V600E) em pólipos serrilhados colorretais, tendo identificado, de maneira semelhante ao estudo anterior, expressão citoplasmática em 100% das lesões serrilhadas sésseis, 94% dos adenomas serrilhados tradicionais e 62% dos pólipos hiperplásicos. Não foi identificada expressão em nenhum dos adenomas convencionais. Em comparação com nossos dados, embora o percentual de positividade em LSS tenha sido menor, ainda assim, identificamos valores próximos ao deste estudo (quase 80%); observou-se ainda grande diferença, em relação aos PH e AST da amostra.

Já em relação aos adenomas serrilhados tradicionais apesar de em *Mesteri e cols* <sup>(78)</sup> ter sido observada positividade em 94% das lesões, nosso estudo identificou apenas 22,2% de lesões positivas para a expressão citoplasmática do BRAF, tendo sido a maioria de fraca intensidade. Mais adiante abordaremos alguns estudos que, embora tenham utilizado metodologia diferente da nossa para a pesquisa da mutação V600 (pesquisa por PCR), apresentam algumas possíveis justificativas para o menor percentual de expressão do BRAF em AST verificado em nosso estudo.

Em seu estudo, *Fu e cols* <sup>(54)</sup> utilizando a metodologia por PCR para a pesquisa da mutação V600E do BRAF em AST, detectou apenas 29% de casos positivos, de certa forma, semelhante ao encontrado em nosso estudo.

Já em *Bentington e cols* <sup>(59)</sup>, utilizando a mesma metodologia (PCR), o percentual de casos de AST positivos para o BRAF foi de 67%, sendo mais frequentes em lesões localizadas em cólon proximal (39%); em nosso estudo, entretanto, apenas 02 lesões (11,1%) eram de localização proximal, o que pode ser uma explicação para o perfil de expressão do BRAF observado em nossa casuística, caso exista alguma diferença em termos de mecanismos de carcinogênese entre AST de cólon proximal, comparadas às lesões de cólon distal; além disso, a frequência deste tipo de lesão é bem menor do que os demais pólipos serrilhados, o que limita avaliações mais conclusivas diante dos diferentes resultados apresentados.

Em relação à concordância entre a pesquisa do BRAF pela imuno-histoquímica e por métodos moleculares, *Rössle e cols* <sup>(33)</sup> demonstraram que o uso de anticorpo para análise imuno-histoquímica para o BRAF alcança sensibilidade e especificidade de 100% e 95% quando utilizado para o diagnóstico de carcinomas colorretais com a mutação V600E deste gene. Em *Kwon e cols* <sup>(32)</sup>, os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para a análise do BRAF por estudo imuno-histoquímico, em carcinomas colorretais foram 96.1%, 94%, 89.1% e 97.9%, respectivamente.

A expressão de Anexina A10 tem sido investigada por diversos autores em PH, LSS e AST <sup>(36,37,38,39,40)</sup>. A amostra do presente estudo mostrou expressão de ANXA10 em 54,8% dos pólipos hiperplásicos, com expressão em 50% ou menos das células. Já a expressão observada em LSS foi de 89,6% das (a maioria - 50% - com marcação acima de 50% das células) e 66,6 % dos AST (sendo 44,4% com 50% ou menos das células marcadas e, somente 22,2%

acima de 50% de expressão). Estes achados são compatíveis com os estudos descritos na literatura <sup>(37,38)</sup>.

*Gonzalo e cols* <sup>(40)</sup> demonstrou por meio de métodos de estudo de comparação genômica e RT-PCR (reação de cadeia de polimerase, tempo real) que os principais genes expressos em PHMV e LSS, também estão presentes em vias de carcinogênese de neoplasias gastrointestinais, como carcinomas pancreáticos, gástricos e colorretais de uma forma geral (*Fatty Acid Binding Protein 6 - FABP6*, *Anexina A10 - ANXA10*, *Trefoil Factor 2 - TFF2*), sendo que destes, apenas ANXA10 mostrou aumento de expressão em relação à mucosa normal, fenômeno não observado em PHMV ( $p < 0,0001$ ).

O uso de anticorpos anti-ANXA10 no mesmo estudo anteriormente referido <sup>(40)</sup>, foi capaz de diagnosticar LSS com positividade acima de 50% das células, com sensibilidade de 73% e especificidade de 95%; foi também descrito que a maioria dos PHMV positivos para o marcador, eram de localização distal e com maior expressão em sua porção apical (dois terços proximais), enquanto para LSS, a expressão foi maior em lesões proximais, com expressão em terço distal das criptas.

*Sajanti e cols* <sup>(38)</sup> descreveram, em uma amostra de 131 pólipos colorretais, positividade para ANXA10 em 100% das LSS, 63% dos PH, 54,5% dos AST, 2% dos ATV e nenhum AT. Este estudo também investigou a positividade de CCR para ANXA10 (por imuno-histoquímica) e BRAF V600E (por RT-PCR), tendo identificado correlação entre as duas mutações identificadas, com 64% de co-expressão destes marcadores, sugerindo uma convergência com a via MAPK-ERK, além de descrever sensibilidade de 42% e especificidade de 98% para expressão de ANXA10 em lesões com morfologia serrilhada.

Em relação à distribuição da expressão do marcador, *Sajanti e cols* <sup>(38)</sup> mostraram ainda que, as LSS exibiram positividade mais homogênea, com expressão média em 50% das células, enquanto demais pólipos exibiram expressão mais heterogênea, com positividade média de 15% das células em PH e 5% em AST e ATV; estes dados são semelhantes aos anteriormente descritos, em nossa casuística.

*Bae J e cols* <sup>(39)</sup> identificaram expressão de ANXA10 em 5,6% de 1133 CCR estudados, além de correlação com fenótipos CIMP+ e MSI+ ( $p < 0,0001$ ). *Carole e cols* <sup>(36)</sup>, por sua vez, descreveu a correlação entre positividade para ANXA10 e risco aumentado (HR, *hazard ratio*, 2.7;  $p = 0.048$ ) de lesões metacrônicas em colonoscopia de seguimento, particularmente em cólon proximal (HR=4.0;  $p = 0.02$ ).

A marcação dos pólipos pelo Ki-67, na amostra estudada, mostrou padrões de expressão característicos para cada diagnóstico; os pólipos hiperplásicos apresentaram expressão predominantemente restrita à zona proliferativa basal (95,2%), as lesões serrilhadas sésseis exibiram um padrão irregular de positividade, consistente com o deslocamento da zona proliferativa para diferentes porções da cripta em 77,1% dos casos, enquanto os adenomas serrilhados tradicionais, em 61,1% das lesões exibiram positividade característica de criptas ectópicas. Os adenomas convencionais mostraram padrão difuso de positividade.

Os achados acima descritos são semelhantes aos descritos por *Torlakovic e cols* <sup>(42)</sup>, cujo autora principal inseriu o termo adenoma serrilhado em 1996 na literatura médica a partir da descrição da Síndrome de Polipose Serrilhada; neste artigo de 2008, o grupo teve como objetivo identificar

alterações morfológicas que permitissem a discriminação entre os diagnósticos de pólipos hiperplásicos, lesões serrilhadas sésseis e adenomas serrilhados tradicionais com base em padrões arquiteturais e de expressão imunohistoquímica pelo Ki-67 e CK20. Embora os autores afirmassem não ser possível a diferenciação dos pólipos serrilhados apenas baseado nos padrões de expressão destes marcadores, eles consideram que o uso dos mesmos pode contribuir adicionalmente na diferenciação entre os tipos de lesão e que, os padrões de distribuição das células Ki-67 positivas nas criptas, foi o fator de maior contribuição diagnóstica ( $p < 0,0001$ ).

De maneira semelhante ao descrito acima, os padrões de expressão apresentados pelos pólipos colorretais de nossa amostra exibiram distribuição estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) contudo, como cada padrão praticamente encontrava-se relacionado a um diagnóstico e, em alguns casos, não foram observados nos demais tipos de lesão, tal quadro não apresentou qualidades estatísticas, em um modelo de regressão logística binária, para ser utilizado como parte de elaboração de um escore diagnóstico.

No que diz respeito à expressão MUC-1 e MLH-1, nossa amostra estudada não demonstrou resultados com maior contribuição para a diferenciação entre os pólipos serrilhados, uma vez que a grande maioria das lesões não apresentou expressão de MUC-1 em 94,2% dos casos e, 100% dos pólipos foram positivos para MLH-1, exceto por 03 casos de perda focal da expressão, o que configura baixa probabilidade de instabilidade microssatélite.

*Molai M e cols* <sup>(48)</sup> correlacionaram o padrão de expressão de mucinas em pólipos colorretais, com positividade de MUC-1 em 23,5% dos adenomas convencionais, 7,8% das lesões serrilhadas sésseis e negativo em todos os 36

(7,9%) pólipos hiperplásicos da casuística ( $p=0,005$ ). Todavia, nossa amostra demonstrou positividade em 16,7% (08) das LSS, 2,4% (1) dos pólipos hiperplásicos e 5,6% (1) dos adenomas serrilhados tradicionais, não tendo sido observado nenhum caso de adenoma convencional positivo; embora a distribuição observada em nosso estudo tenha se mostrado estatisticamente significativa ( $p<0,0002$ ), ela difere substancialmente do estudo anteriormente citado <sup>(48)</sup>, merecendo mais análises para uma conclusão definitiva do papel deste marcador. Ademais, a escassa quantidade de casos positivos, não permitiu a entrada desta variável, após a regressão logística, no escore diagnóstico.

A relação entre instabilidade microssatélite e metilação do gene *MLH1* é amplamente descrita por vários autores e capítulos de livros de referência <sup>(9,18,44,53,80)</sup>. *He and Cols* <sup>(18)</sup> estimam que cerca de apenas 3% dos pólipos serrilhados apresentem perda de expressão do MLH-1 e, portanto, maior probabilidade de instabilidade microssatélite. *Kim J e cols* <sup>(44)</sup> descrevem a relação entre perda (total) da expressão de MLH-1 em pólipos serrilhados com displasia e, a possibilidade de identificação de perda focal de expressão em lesões não displásicas, podendo representar um sinal iminente do surgimento de displasia.

Os casos de perda focal de expressão do MLH-1 de nossa amostra são constituídos por 02 LSS-CD e 01 AST, contudo nem a correlação com o diagnóstico ou a correlação com displasia mostraram significância estatística ( $p=0,107$  e  $p=0,248$ , respectivamente).

Por fim, foi objetivo deste estudo a criação de um escore com base na probabilidade de que uma ou mais das variáveis estudadas pudessem ser

aplicadas como uma ferramenta para o diagnóstico de lesões serrilhadas sésseis, uma vez que estas são as que mais apresentam critérios estritos para o diagnóstico, muitos deles diferentes, dependendo dos autores e dos consensos internacionais <sup>(5,9,23,53)</sup> e, a concordância interobservador mostra-se de fraca a moderada <sup>(65-74,81,82)</sup>.

Uma condição pouco abordada nos estudos de concordância interobservador e reclassificação dos pólipos serrilhados, mas frequente na rotina do patologista, é a dificuldade que por vezes existe para se diferenciar um pólipo hiperplásico de uma lesão reacional. Uma possível explicação poderia ser a presença de características microscópicas de hiperplasia de criptas e aspecto polipoide observado nas colonoscopias, em lesões reacionais ou inflamatórias, agindo como um fator de confusão.

Outro dado que poderia justificar esta situação, seria a ainda falta de reconhecimento por parte dos patologistas do potencial neoplásico de pólipos hiperplásicos, como lesões básicas da via serrilhada de carcinogênese, optando por este diagnóstico no momento da avaliação de uma lesão suspeita (tanto na colonoscopia, quanto no exame microscópico), uma vez que possa considerar a mesma como inofensiva ou sem potencial carcinogênico.

Os baixos índices de concordância entre lesões serrilhadas sésseis e adenomas serrilhados tradicionais traz uma ideia do real problema no diagnóstico destas lesões, que acabam sendo confundidas não apenas entre si, mas também com lesões que vão desde aquelas de caráter reacional e pólipos hiperplásicos, até os adenomas convencionais. Com relação aos primeiros, é reconhecido que os pólipos hiperplásicos são os principais simuladores de lesões serrilhadas e que, no passado, boa parte das lesões serrilhadas sésseis

acabava por receber os diagnósticos de pólipos hiperplásicos ou pólipos mistos hiperplásicos-adenomatosos <sup>(67,68,70,71)</sup>. Por sua vez, contudo, a diferenciação diagnóstica entre adenomas convencionais (principalmente com lesões serrilhadas sésseis), não costuma oferecer grandes dificuldades, não havendo muitos relatos na literatura pesquisada; uma observação entretanto, que merece ser considerada, é a percepção por parte dos patologistas de que os adenomas serrilhados são lesões com displasia, sendo que na realidade, a presença de displasia (convencional ou serrilhada) nestas lesões, é fenômeno pouco frequente, correspondendo, as lesões com displasia a apenas cerca de 5% das lesões serrilhadas sésseis e menos de 0,04% de todos os pólipos colorretais <sup>(75)</sup>.

Ademais, é frequente a presença de alterações hiperplásicas nas criptas de adenomas convencionais, muitas vezes levando o patologista a utilizar a terminologia prévia de pólipo misto hiperplásico-adenomatoso. Esta denominação, que já não era mais prevista na classificação de 2010 da OMS como um tipo específico de lesão serrilhada, aparentemente veio a ser novamente considerada na nova classificação<sup>(53)</sup>, “sob o guarda-chuva” da terminologia de *Adenoma Serrilhado Não-Classificável* que, conforme a própria publicação, contempla “pólipos serrilhados displásicos com difícil distinção entre adenomas serrilhados tradicionais e lesões serrilhadas sésseis com displasia, podendo ser incluídos neste grupo os recém descritos adenomas túbulo-vilosos serrilhados”; a frequência e os critérios microscópicos mínimos deste tipo de lesão ainda não foram definidos.

A definição de novos critérios para o diagnóstico de LSS a partir da publicação de 2019 da OMS <sup>(53)</sup>, traz a necessidade de novos estudos avaliando

a reclassificação de pólipos serrilhados, uma vez que os estudos anteriores na literatura usam como base as definições da edição de 2010 <sup>(9)</sup>.

No que diz respeito à utilização de escores combinando variáveis clínicas, morfológicas e/ou imuno-histoquímicas para o diagnóstico das lesões serrilhadas sésseis, até onde é de nosso conhecimento, não existe ainda um estudo que tenha proposto tal objetivo.

*Bouwens M e cols* (83) foi o único trabalho identificado em nosso levantamento bibliográfico que se propôs a elaborar um escore utilizando variáveis clínicas para predição da chance de detecção de pólipos serrilhados, de grandes dimensões (acima de 6 mm), localizados em cólon proximal ou displásicos, utilizando um questionário individual, auto aplicado, para pacientes da coorte de derivação; a partir dos dados deste questionário, variáveis clínicas reconhecidas como possíveis fatores de risco tal quais, obesidade (através do índice de massa corpórea – IMC), tabagismo, consumo de álcool e anti-inflamatório não esteróides, além de dados demográficos e história de identificação de lesão serrilhada séssil em colonoscopias prévias, foram coletadas.

Da coorte de derivação 2244 pacientes e, 2402 de uma segunda coorte (de validação) foram submetidos a colonoscopia. Fatores de risco independentes identificados foram: idade acima de 50 anos (*Odds Ratio* – OR: 2.2; 95% de intervalo de confiança (IC), 1.3–3.8;  $p = 0.004$ ), histórico de pólipos serrilhados (OR: 2.6; 95% IC, 1.3–4.9;  $p = 0.005$ ), tabagismo atual (OR: 2.2; 95% IC, 1.4–3.6;  $p = 0.001$ ) e, uso não-diário ou não uso de ácido acetil-salicílico (AAS) (OR: 1.8; 95% IC, 1.1–3.0;  $p = 0.016$ ).

Para validação do escore foi utilizada a soma dos valores arredondados de OR; pacientes apresentando em seus questionários valores maiores ou iguais a 5, eram considerados de alto risco, associados a uma chance 3 vezes maior de pólipos serrilhados grandes, com ou sem displasia, em cólon direito, quando comparados a pacientes com menos de 5 pontos, tendo sido considerados como fatores de risco independentes, idade acima de 50 anos, histórico pessoal de pólipos serrilhados prévios, tabagismo atual e não-uso ou uso não diário de AAS. Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados, usando como ponto de corte, mais de 5 pontos, foi de 33,2% (95% IC, 27.0%–40.0%) e 93.5% (95% IC, 92.4%–94.5%), respectivamente.

Nosso trabalho identificou como uma maior probabilidade de diagnóstico de LSS, a partir da utilização do parâmetro (valor) beta obtido através de regressão logística binária multivariada, a localização da lesão em cólon direito (OR: 9,6, beta 2,26 – 3 pontos), BRAF positivo (OR: 5,0, beta 1,61 – 2 pontos), a expressão de ANXA10 positivo entre 6 e 50% (OR: 2,1, beta 0,76 – 1 ponto) e ANXA10 positivo acima de 50% (OR: 24,2, beta 3,19 – 4 pontos), em um escore que pode variar desde 0 a 9, onde 0 representa pólipos colorretais sem nenhuma das características acima e 9, um pólipo, localizado em cólon direito, BRAF positivo e ANXA10 positivo acima de 50%.

A análise da Curva ROC e da área sob a curva estimaram o melhor ponto de corte o valor de escore 4, para o diagnóstico de lesão serrilhada séssil, com valores de sensibilidade de 66.7%, especificidade de 83,3% e acurácia de 75,9%. Em última análise, isso significa dizer que, para a população estudada nesta amostra, as características que mostraram maior correlação, ou ainda, capacidade de predição do diagnóstico de lesão serrilhada séssil, seriam a

localização em cólon direito e ANXA10 positivo acima de 50% (o que corresponderia a um valor de 7 pelo escore proposto). De acordo com nossas análises, lesões com escore a partir de 7, já permitiriam, portanto, afirmar um diagnóstico de LSS com 100% de especificidade.

Embora os valores de sensibilidade e especificidade obtidos com a utilização do escore elaborado a partir do presente estudo não permitam considerá-lo como um teste padrão ouro para o diagnóstico de tais lesões, esta pode vir a ser uma ferramenta útil, adjuvante no processo de decisão diagnóstica pelo médico patologista, aliado aos critérios já estabelecidos e, recentemente revistos, na última edição da OMS <sup>(53)</sup>.

Acreditamos que o escore neste estudo apresentado, assim como qualquer outra avaliação por estudo imuno-histoquímico, represente método complementar, não pretendendo de forma alguma sobrepor-se a análise morfológica, mas sim representar a possibilidade de mais um fator adjuvante ao diagnóstico.

## 7. CONCLUSÕES

- As características mais observadas em lesões serrilhadas sésseis foram o serrilhamento luminal distal, seguido da irregularidade de 03 ou mais criptas e a dilatação frequente da base da cripta.
- Inversamente, a presença de serrilhamento luminal proximal foi observado em todos dos pólipos hiperplásicos e, na grande maioria destes, não se observou irregularidade de criptas.
- Apenas em uma pequena minoria das lesões serrilhadas foi possível classificá-las como tal baseado na presença de irregularidade em apenas 01 cripta, conforme os novos critérios da OMS contudo, a inclusão desta categoria, juntamente com lesões com irregularidade em 02 a 03 criptas, permitiu identificar a grande maioria das lesões da amostra.
- A presença de serrilhamento luminal “slit-like” (ou ramificação de criptas) e núcleos “pencilados” (alongados) foi observada em todos os AST, seguidas da presença de criptas ectópicas e eosinofilia citoplasmática na grande maioria dos casos.
- A expressão de ANXA10 foi mais frequente em pólipos hiperplásicos, lesões serrilhadas sésseis e adenomas serrilhados tracionais, contudo, a maioria dos PH e AST expressou marcação entre 6 a 50% das células, enquanto a maioria das LSS exibiu acima de 50% das células positivas para este marcador.
- Observou-se positividade para o BRAF na maioria dos PH e LSS e, predominantemente de fraca intensidade.

- Tanto ANXA10 quanto BRAF não foram expressos em nenhum adenoma convencional da amostra.
- A análise do Ki-67 permitiu a observação de padrões mais característicos de expressão para cada tipo de lesão, podendo ser empregado como um dado a mais na investigação diagnóstica em correlação com o tipo de lesão suspeita. Todavia, não foi observada capacidade de inclusão desta variável em escore diagnóstico considerando a expressão do marcador.
- O uso de MLH-1 e MUC-1 não contribuiu como parâmetro para diagnóstico, uma vez que a grande maioria das lesões serrilhadas e não-serrilhadas apresentou negatividade para MUC-1 e expressão de MLH-1 (baixa probabilidade de instabilidade microssatélite).
- Dentre todas as variáveis estudadas, a localização em cólon direito, a expressão de BRAF e de ANXA10 acima de 50% foram características observadas na maioria das lesões serrilhadas sésseis e permitiu a elaboração de um escore simplificado que, considerando como ponto de corte o valor 4, levou à detecção de LSS com valores de sensibilidade de 66,7%, especificidade de 83,3% e acurácia de 75,9%.
- Os adenomas convencionais expressaram mais comumente características como estratificação nuclear, presença de displasia e de “crowding”, além de não expressarem positividade para BRAF e ANXA10 em nenhum dos casos estudados. Características próprias de pólipos serrilhados como serrilhamento luminal, dilatação da base da cripta e irregularidade de cripta foram observadas em frequências muito pequenas nos adenomas convencionais.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao término deste trabalho foi possível descrever em uma amostra de 172 pólipos colorretais, a distribuição das principais lesões de acordo com a localização no cólon, a faixa etária mais acometida e a distribuição de acordo com o sexo. Além disso, com base na classificação mais recente da OMS, foram descritas as principais características morfológicas e de expressão dos marcadores imuno-histoquímicos estudados, particularmente de dois relacionados à via serrilhada, o BRAF e a Anexina A10. A partir das correlações entre estas variáveis e os tipos de pólipos colorretais, estabeleceu-se um escore simplificado para o diagnóstico de lesões serrilhadas sésseis, com 75,9% de acurácia.

Ressalte-se ainda que, muito embora os objetivos principais do trabalho estejam relacionados ao diagnóstico de pólipos serrilhados e que, a elaboração do escore não tenha contemplado os adenomas convencionais, é fato relevante a ausência de expressão na amostra estudada em relação aos marcadores BRAF e Anexina A10. Assim, podemos inferir que, diante de lesões exibindo positividade para algum destes marcadores, o diagnóstico de adenoma convencional pode ser facilmente descartado.

A maioria das variáveis morfológicas, clínico-epidemiológicas e algumas variáveis imuno-histoquímicas não apresentaram qualidades estatísticas para a formulação do escore, o que pode conferir uma menor aplicabilidade deste método na rotina diária, uma vez que demanda a utilização de anticorpos não rotineiramente disponíveis comercialmente de rotina. Entretanto, tendo em vista a frequência das lesões serrilhadas e, por vezes, a sua dificuldade diagnóstica,

acreditamos que sejam razões suficientes para que estes anticorpos sejam adquiridos, mesmo porque, poderão auxiliar no diagnóstico de outras condições que também expressem estes marcadores.

As características morfológicas analisadas comportaram-se, praticamente, como definidoras dos diferentes diagnósticos, como por exemplo, a característica de núcleos alongados ou “pencilados” em adenomas serrilhados tradicionais; praticamente não houve identificação desta característica nos outros diagnósticos, o que impossibilitou a sua inclusão na elaboração do escore. Muito embora esse seja um dado extremamente relevante em testes diagnósticos, ou seja, quando as características estudadas basicamente definem um diagnóstico, a sua avaliação utilizando métodos de regressão logística é prejudicada, pois a concentração de determinada variável explicativa em um só diagnóstico (variável resposta), não oferece boas qualidades estatísticas para o modelo de regressão logística, o que o leva a reduzir o número de variáveis explicativas, selecionando apenas as que mais contribuem para a explicação da variável resposta<sup>(84)</sup>.

Por fim, é importante que futuramente os resultados obtidos nesta pesquisa possam ser replicados em outros estudos, com uma coorte de validação, diante das novas experiências que irão surgir com a utilização da nova classificação da OMS na rotina diária. Espera-se assim que seja possível avaliar melhor a sua reprodutibilidade e aplicabilidade, como uma estratégia adicional a ser utilizada pelo patologista, nesta já tão árdua tarefa que envolve o diagnóstico histopatológico dos pólipos serrilhados colorretais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kumar V, Abbas AK, Aster, JC. **Robbins & Cotran Patologia. Bases Patológicas da Doença.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. Capítulo 17, O Trato Gastrointestinal; 828-838.
2. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de Intestino. Estatísticas** [Internet]. 2021[atualizado em 19 de agosto de 2021-18h03 ; acessado em 21 de novembro de 2021]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>.
3. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. **Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia.** Am J Surg Pathol 1990;14: 524–537.
4. Arends MJ. **Pathways of Colorectal Carcinogenesis.** Appl Immunohistochem Mol Morphol 2013; 21: 97–102.
5. East JE, Atkins WS, Bateman AC et al. **British Society of Gastroenterology position statement on serrated polyps in the colon and rectum.** Gut 2017; 66: 1181-1196.
6. Gill P, Rafferty H, Munday D, Bailey A, Wang LM, East JE, Chetty R, Leedham SJ. **Proximal colon cancer and serrated adenomas – hunting the missing 10%.** Clinical Medicine 2013; 13 (6): 557–61.
7. Yachida S, Mudali S, Martin SA, Montgomery EA, Iacobuzio-Donahue CA. **Beta-Catenin Nuclear labeling is a common feature of sessile serrated adenomas and correlates with early neoplastic progression following BRAF activation.** Am J Surg Pathol 2009; 33(12): 1823–1832.
8. Szyllberg A, Janiczek M, Popiel A, MarszaBek A. **Serrated polyps and their alternative pathway to the colorectal cancer: a systematic review.** Gastroenterology Research and Practice 2015; 1:1-7.
9. Snover DC, Ahnen DJ, Burt RW, et al. **Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis.** In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2010; 160-171.
10. Bordaçahar B, Barret M, Terris B et al. **Sessile serrated adenoma: from identification to resection.** Digestive and Liver Disease 2015; 47:95–102.
11. Torlakovic EE, Snover DC. **Serrated adenomatous polyposis in humans.** Gastroenterology 1996; 110:748–55.

12. Kim KM, Lee EJ, Ha S, Kang SY, Jang KT, Park, CK et al. **Molecular features of colorectal hyperplastic polyps and sessile serrated adenoma/polyps from Korea.** *Am J Surg Pathol* 2011; 35:1274–1286.
13. Jass JR: **Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features.** *Histopathology* 2007; 50:113-130.
14. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. **A technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing.** *Gastroenterology* 2001; 121:198-213.
15. Batts KP. **The pathology of serrated colorectal neoplasia: practical answers for common questions.** *Modern Pathology* 2015; 28: S80–S87.
16. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. **Genetic alterations during colorectal tumor development.** *N Engl J Med* 1988; 319:525-532.
17. Tariq K, Ghias K. **Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms.** *Cancer Biol Med* 2016; 13 (1): 120 - 135.
18. He EY, Wyld L, Sloane MA, Canfell K, Ward RL. **The molecular characteristics of colonic neoplasms in serrated polyposis: a systematic review and meta-analysis.** *J Pathol: Clin Res* July 2016; 2: 127–137
19. Park SJ, Rashid A, Lee JH, Kim SG, Hamilton SR, Wu TT. **Frequent CpG Island Methylation in Serrated Adenomas of the Colorectum.** *American Journal of Pathology*, 2003; 162 (3): 815 – 822.
20. Ribic CM, Sargent DJ, Moor MJ, et al. **Tumor microsatellite instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjunctive chemotherapy for colon carcinoma.** *N Engl J Med* 2003; 349:247-257.
21. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, et al. **Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer.** *Gastroenterology* 2004; 126:394-401.
22. Guarinos C, Sánchez-Fortún C, Rodríguez-Soler M, Alenda C, Payá A, Jover R. **Serrated polyposis syndrome: Molecular, pathological and clinical aspects.** *World J Gastroenterol* 2012; 18(20): 2452-2461
23. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW et al. **Serrated Lesions of the Colorectum: Review and Recommendations from an Expert Panel.** *Am J Gastroenterol.* 2012; 107(9): 1315–1330.
24. Rosty C, Hewett DG, Brown IS, Leggett BA, Whitehall VLJ. **Serrated polyps of the large intestine: Current Understanding of Diagnosis,**

- Pathogenesis, and Clinical Management.** J Gastroenterol 2013; 48:287–302.
25. Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimarães DP. **Serrated pathway in colorectal carcinogenesis.** World J Gastroenterol 2014; 20(10): 2634-2640.
  26. Rosty C, Parry S, Young JP. **Serrated Polyposis: An Enigmatic Model of Colorectal Cancer Predisposition.** Pathology Research International 2011; 1: 1-13.
  27. Bateman AC, Sheperd NA. **UK guidance for the pathological reporting of serrated lesions of the colorectum.** J Clin Pathology 2015;68: 585-591.
  28. Renaud F, Mariette C, Vincent A, Wacrenier A, Maunoury V, Leclerc J, Coppin L, Crépin M, Van Seuningen I, Leteurtre E, Buisine MP. **The serrated neoplasia pathway of colorectal tumors: Identification of MUC5AC hypomethylation as an early marker of polyps with malignant potential.** Int J Cancer 2016;138(6):1472-81.
  29. Kaji E, Uraoka T, Kato J, Hiraoka S, Suzuki H, Akita M, et al. **Externalization of saw-tooth architecture in small serrated polyps implies the presence of methylation of IGFBP7.** Dig Dis Sci. 2012; 57:1261–70.
  30. Boulagnon C, Dudev O, Beaudoux O, Dalstein V, Kianmanesh R, Bouché O, Diebold MD. **BRAFV600E Gene Mutation in Colonic Adenocarcinomas. Immunohistochemical Detection Using Tissue Microarray and Clinicopathologic Characteristics: An 86 Case Series.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2016; 24(2): 88-96.
  31. Rahman MA, Salajegheh A, Smith RA, Lam AKY. **B-Raf mutation: A key player in molecular biology of cancer.** Exp. Mol. Pathol. 2013; 95(3): 336–342.
  32. Kwon JH, Jeong BK, Yoon YS, Yu CS, Kim J. **Utility of BRAF VE1 Immunohistochemistry as a Screening Tool for Colorectal Cancer Harboring BRAF V600E Mutation.** J Pathol Transl Med. 2018; 52(3):157-163.
  33. Rössle M, Sigg M, Rüschoff JH, et al. **Ultra-deep sequencing confirms immunohistochemistry as a highly sensitive and specific method for detecting BRAF V600E mutations in colorectal carcinoma.** Virchows Arch. 2013;463(5):623-631.
  34. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. **Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or**

- cetuximab in metastatic colorectal cancer.** J Clin Oncol. 2008;26(35):5705-12.
35. Toon CW, Walsh MD, Chou A, Capper D, Clarkson A, Sioson L, Clarke S, Mead S, Walters RJ, Clendenning M, Rosty C, Young JP, Win AK, Hopper JL, Crook A, von Deimling A, Jenkins MA, Buchanan DD, Gill AJ. **BRAFV600E immunohistochemistry facilitates universal screening of colorectal cancers for Lynch syndrome.** Am J Surg Pathol. 2013;37(10):1592-602.
36. Macaron C, Lopez R, Pai RK, Burke CA. **Expression of Annexin A10 in Serrated Polyps Predicts the Development of Metachronous Serrated Polyps.** Clin Transl Gastroenterol. 2016;7(12):e205.
37. Mussunoor S, Murray GI. **The role of annexins in tumour development and progression.** J Pathol 2008; 216: 131–140.
38. Sajanti SA, Väyrynen JP, Sirniö P, Klintrup K, Mäkelä J, Tuomisto A, Mäkinen MJ. **Annexin A10 is a marker for the serrated pathway of colorectal carcinoma.** Virchows Arch. 2015;466(1):5-12.
39. Bae JM, Kim JH, Rhee YY, Cho NY, Kim TY, Kang GH. **Annexin A10 expression in colorectal cancers with emphasis on the serrated neoplasia pathway.** World J Gastroenterol. 2015;21(33):9749-57.
40. Gonzalo DH, Lai KK, Shadrach B, Goldblum JR, Bennett AE, Downs-Kelly E, Liu X, Henricks W, Patil DT, Carver P, Na J, Gopalan B, Rybicki L, Pai RK. **Gene expression profiling of serrated polyps identifies annexin A10 as a marker of a sessile serrated adenoma/polyp.** J Pathol. 2013; 230(4) :420-9.
41. Melo ES, Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J e cols. **Sociedade Brasileira de Patologia – Manual de Imuno-Histoquímica.** 1ª Ed, São Paulo. Capítulo 22. Glossário dos Principais Marcadores Imuno-Histoquímicos. 1999; p.267.
42. Torlakovic EE, Gomez JD, Driman DK, Parfitt JR, Wang C, Benerjee T, Snover DC. **Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA).** Am J Surg Pathol. 2008 Jan;32(1):21-9.
43. Lee JA, Park HE, Yoo SY, Jeong S, Cho NY, Kang GH, Kim JH. **CpG Island Methylation in Sessile Serrated Adenoma/Polyp of the Colorectum: Implications for Differential Diagnosis of Molecularly High-Risk Lesions among Non-dysplastic Sessile Serrated Adenomas/Polyps.** J Pathol Transl Med. 2019;53(4):225-235.
44. Kim JH, Kang GH. **Evolving pathologic concepts of serrated lesions of the colorectum.** J Pathol Transl Med. 2020;54(4):276-289.

45. Amemori S, Yamano HO, Tanaka Y, Yoshikawa K, Matsushita HO, Takagi R, Harada E, Yoshida Y, Tsuda K, Kato B, Tamura E, Eizuka M, Sugai T, Adachi Y, Yamamoto E, Suzuki H, Nakase H. **Sessile serrated adenoma/polyp showed rapid malignant transformation in the final 13 months.** *Dig Endosc.* 2020;32(6):979-983.
46. Liu C, Bettington ML, Walker NI, et al. **CpG island methylation in sessile serrated adenomas increases with age, indicating lower risk of malignancy in young patients.** *Gastroenterology* 2018; 155: 1362-5.
47. Lee JA, Park HE, Yoo SY, et al. **CpG island methylation in sessile serrated adenoma/polyp of the colorectum: implications for differential diagnosis of molecularly high-risk lesions among non-dysplastic sessile serrated adenomas/polyps.** *J Pathol Transl Med* 2019; 53: 225-35.
48. Molaei M, Mansoori BK, Mashayekhi R, Vahedi M, Pourhoseingholi MA, Fatemi SR, Zali MR. **Mucins in neoplastic spectrum of colorectal polyps: can they provide predictions?** *BMC Cancer.* 2010; 10:537.
49. Swallow DM, Gendler S, Griffiths B, Kearney A, Povey S, Sheer D, Palmer RW, Taylor-Papadimitriou J. **The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumor associated epithelial mucins, is located on chromosome 1, within the region 1q21-24.** *Ann Hum Genet* 1987, 51:289-294.
50. Perçinel S, Savaş B, Ensari A, Kuzu I, Kuzu MA, Bektaş M, Cetinkaya H, Kurşun N. **Mucins in the colorectal neoplastic spectrum with reference to conventional and serrated adenomas.** *Turk J Gastroenterol* 2007, 18:230-238.
51. Khaidakov M, Lai KK, Roudachevski D, Sargsyan J, Goyne HE, Pai RK, Lamps LW, Hagedorn CH. **Gastric Proteins MUC5AC and TFF1 as Potential Diagnostic Markers of Colonic Sessile Serrated Adenomas/Polyps.** *Am J Clin Pathol.* 2016 1;146(5):530-537.
52. Hamilton SR, Sekine, S. **Conventional Adenoma.** In: **World Health Organization Classification. Digestive System Tumours.** 5th ed. Lyon: IARC Press. 2019; 170-173.
53. Pai RK, Mäkinen MJ, Rosty C. **Colorectal serrated lesion and polyps.** In: **World Health Organization Classification. Digestive System Tumours.** 5th ed. Lyon: IARC Press. 2019; 163-169.
54. Fu B, Yachida S, Morgan R, Zhong Y, Montgomery EA, Iacobuzio-Donahue, CA. **Clinicopathologic and Genetic Characterization of Traditional Serrated Adenomas of the Colon.** *Am J Clin Pathol* 2012; 138(3): 356–366.

55. Vatn MH, Stalsberg H. **The prevalence of polyps of the large intestine in Oslo: An autopsy study.** *Cancer* 1982; 49:819-825.
56. Sweetser S, Smyrk TC, Sincrope FA. **Serrated Colon Polyps as Precursors to Colorectal Cancer.** *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2013;11 (7): 760-767.
57. Liu C, Walker NI, Leggett BA, Whitehall VL, Bettington ML, Rosty C. **Sessile serrated adenomas with dysplasia: morphological patterns and correlations with MLH1 immunohistochemistry.** *Mod Pathol.* 2017;30(12):1728-1738.
58. Sheridan TB, Fenton H, Lewin MR, et al. **Sessile serrated adenomas with low- and high-grade dysplasia and early carcinomas: an immunohistochemical study of serrated lesions 'caught in the act'.** *Am J Clin Pathol* 2006; 126:564–571.
59. Bettington ML, Walker NI, Rosty C, Brown IS, Clouston AD, McKeone DM, Pearson SA, Klein K, Leggett BA, Whitehall VL. **A clinicopathological and molecular analysis of 200 traditional serrated adenomas.** *Mod Pathol.* 2015; 28(3):414-27.
60. Mäkinen MJ. **Colorectal serrated adenocarcinoma.** *Histopathology.* 2007; 50 (1): 131-50.
61. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S et al In: Hamilton S.R., Aaltonen L.A. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.** 3rd ed. Lyon: IARC Press. 2000; 113–114.
62. Bettington M, Walker N, Rosty C, Brown I, Clouston A, McKeone D, Pearson SA, Klein K, Leggett B, Whitehall V. **Serrated tubulovillous adenoma of the large intestine.** *Histopathology.* 2016 Mar;68(4): 578-87.
63. Rex DK, Boland CR, Dominitz JA, Giardiello FM, Johnson DA, Kaltenbach T, Tr Levin, Lieberman D, DJ Robertson. **Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients from the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal.** *Cancer Am J Gastroenterol.* 2017; 112:1016–1030.
64. Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, et al. **Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer.** *Gastroenterology.* 2012; 143:844–857.
65. Wong NA, Hunt LP, Novelli MR, Shepherd NA, Warren BF. **Observer agreement in the diagnosis of serrated polyps of the large bowel.** *Histopathology* 2009; 55: 63-66.

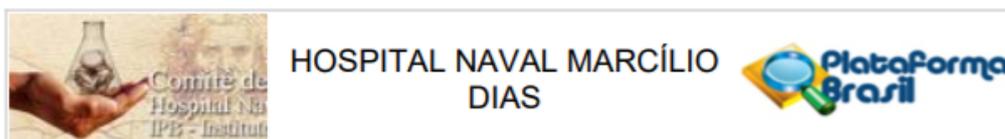
66. Ensari A, Bilezikçi B, Carneiro F et al. **Serrated polyps of the colon: how reproducible is their classification?** Arch Virchows. 2012; 461: 495–504.
67. Rau TT, Abbas A, Gehoff A et al. **Defined morphological criteria allow reliable diagnosis of colorectal serrated polyps and predict polyp genetics.** Virchows Arch. 2014; 464:663–672
68. Farris AB, Misdraji J, Srivastava A, Muzikansky A, Desphande V, Lauwers GY, Mino-Kenudson M. **Sessile serrated adenoma. Challenging discrimination from other serrated colonic polyps.** Am J Surg Pathol. 2008; 32:30–35.
69. Glatz K, Pritt B, Glatz D, Harmann A, O'Brien MJ, Blaszyk H. **A multinational, internet-based assessment of observer variability in the diagnosis of serrated colorectal polyps.** Am J Clin Pathol. 2007; 127:938–945
70. Khalid O, Radaideh S, Cummings OW, O'Brien MJ, Goldblum JR, Rex DK **Reinterpretation of histology of proximal colon polyps called hyperplastic in 2001.** World J Gastroenterol. 2009; 15:3767–3770
71. Gill P, Wang LM, Bailey A, et al. **Reporting trends of right-sided hyperplastic and sessile serrated polyps in a large teaching hospital over a 4-year period (2009–2012).** J Clin Pathol 2013. 66: 655-658.
72. Baldin, RKS, Anselmi Jr RA, Azevedo M, Sebastião APM, Montemord M, Tullio LF, Soares LFP, Noronha L. **Interobserver variability in histological diagnosis of serrated colorectal polyps.** J Coloproctol. 2015; 35(4).193–197.
73. Gunia S, Berg T, Gradhand E, Becker S. **Knowledge of the anatomical polyp location might bias the pathological classification of histologically equivocal colorectal serrated polyps—a consensus study performed by pathology trainees.** Pract Path Res. 2011; 207:116–120
74. Bustamante-Balen, Marco & Bernet, Laia & Cano, R & Morell, L & López, A. **Assessing the reproducibility of the microscopic diagnosis of sessile serrated adenoma of the colon.** Revista Española de Enfermedades Digestivas: Organo Oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva. 2009; 101. 258-64.
75. Bettington M. **Serrated Colorectal Polyps and the Serrated Neoplasia Pathway. An Update on the Pathology and Clinical Significance.** Apresentação em: Annual Scientific Meeting of the Australasian Gastrointestinal Pathology Society; 9 a 10 Outubro de 2015; Sidnei, Australia. [Internet]. 2015[acessado em 16 de setembro de 2018].

Disponível em:  
[http://www.agps.org.au/resources/AGM\\_Staff/2015\\_AGM\\_presentations/Bettington\\_SSP.pdf](http://www.agps.org.au/resources/AGM_Staff/2015_AGM_presentations/Bettington_SSP.pdf)

76. Fitzgibbons PL, Bartley AN, Broaddus RR, Shi C. Template for Reporting Results of DNA Mismatch Repair Testing [Internet]. 2021[versão 1.0 0.2 atualizado junho 2021; acessado em 18 de julho de 2021]. Disponível em: [https://documents.cap.org/protocols/DNA.MMR.Bmk\\_1.0.0.2.REL\\_CAP\\_CP.pdf](https://documents.cap.org/protocols/DNA.MMR.Bmk_1.0.0.2.REL_CAP_CP.pdf).
77. Haque TR, Bradshaw PT, Crockett SD. **Risk factors for serrated polyps of the colorectum.** Dig Dis Sci. 2014;59(12): 2874-89.
78. Mesteri I, Bayer G, Meyer J, Capper D, Schoppmann SF, von Deimling A, Birner P. **Improved molecular classification of serrated lesions of the colon by immunohistochemical detection of BRAF V600E.** Mod Pathol. 2014; 27(1): 135-44.
79. Väyrynen S. **Histological and molecular features of serrated colorectal adenocarcinoma and its precursor lesions.** [Tese de Doutorado]. University of Oulu, Finland. 2016 [acessado em 16 de setembro de 2018]. Disponível em: <http://jultika.oulu.fi/files/isbn9789526212883.pdf>
80. Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. **Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps.** Am J Surg Pathol. 2003;27(1):65-81
81. Bariol C, Hawkins NJ, Turner JJ, Meagher AP, Williams DB, Ward RL. **Histopathological and clinical evaluation of serrated adenomas of the colon and rectum.** Mod Pathol. 2003;16(5):417-23.
82. Sandmeier D, Seelentag W, Bouzourene H. **Serrated polyps of the colorectum: is sessile serrated adenoma distinguishable from hyperplastic polyp in a daily practice?** Virchows Arch. 2007;450(6):613-8
83. Bouwens MW, Winkens B, Rondagh EJ, Driessen AL, Riedl RG, Masclee AA, Sanduleanu S. **Simple clinical risk score identifies patients with serrated polyps in routine practice.** Cancer Prev Res (Phila). 2013;6(8):855-63.
84. Bledsoe JR, Kamionek M, Mino-Kenudson M. **BRAF V600E immunohistochemistry is reliable in primary and metastatic colorectal carcinoma regardless of treatment status and shows high intratumoral homogeneity.** Am J Surg Pathol. 2014;38(10):1418-28.
85. Dantas D, Donadia E. **Comparação entre as técnicas de regressão logística, árvore de decisão, bagging e random forest aplicadas a**

- um estudo de concessão de crédito.** [Trabalho de conclusão de curso]. Universidade Federal do Paraná. 2013 [acessado em 12 de setembro de 2021]. Disponível em: [http://www.coordest.ufpr.br/wp-content/uploads/2018/12/TCC\\_DanielEricson.pdf](http://www.coordest.ufpr.br/wp-content/uploads/2018/12/TCC_DanielEricson.pdf)
86. Kokenek-Unal TD, Senel F, Gurcay N, Tasdemir A, Coban I. **Immunohistochemical expression profiles of BRAF (V600E/VE1) in serrated colon polyps in Turkish population.** Int J Clin Exp Pathol. 2017;10(8):8868-8874.
87. Capper D, Berghoff AS, Magerle M, et al. **Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases.** Acta Neuropathol. 2012;123(2):223-233.
88. Tanaka S, Kaltenbach T, Chayama K, Soetikno R. **High-magnification colonoscopy.** Gastrointest Endosc. 2006;64(4):604-613.

## ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



Continuação do Parecer: 2.906.939

### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados.

### Recomendações:

Sem recomendações.

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências respondidas.

Faz-se necessário apresentar a este CEP via Plataforma Brasil, relatório semestral até o término da pesquisa, com o primeiro relatório previsto para MARÇO de 2019. Todavia, se realizada num período menor, deverá ser apresentado relatório final, assim como este Comitê deverá ser informado sobre fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. Caso o projeto venha a ser interrompido, haverá necessidade de justificativa do pesquisador.

### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1212990.pdf	16/09/2018 15:15:46		Aceito
Outros	Formulario_de_resposta_as_pendencias_do_CEP_HNMD.doc	16/09/2018 15:15:12	Cesar de Souza Bastos Junior	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_CESAR_BASTOS_JUNIOR_modificada.pdf	16/09/2018 15:13:20	Cesar de Souza Bastos Junior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DOUTORADO_LESOES_SERRILHADAS_CESAR_BASTOSJR_VE_RSAO_CEP.doc	02/09/2018 17:29:54	Cesar de Souza Bastos Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PEDIDO_DE_DISPENSA_DO_TERMODE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESC_LARECIDO.doc	02/09/2018 17:28:41	Cesar de Souza Bastos Junior	Aceito

### Situação do Parecer:

Aprovado

### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

P	97538818.9.0000.5256	2	Cesar de Souza Bastos Junior	5256 - Hospital Naval Marcílio Dias	PO	PO	Aprovado	
---	----------------------	---	------------------------------	-------------------------------------	----	----	----------	--

## ANEXO B – PUBLICAÇÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Published online: 2021-07-19

430 Review Article



## Morphological Characteristics, Classifications and Difficulties in the Use of Diagnostic Criteria for Serrated Lesions of the Large Intestine

Cesar de Souza Bastos Junior<sup>1</sup> Vera Lucia Nunes Pannain<sup>1</sup> Adriana Caroli-Bottino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Anatomia Patológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Address for correspondence: Cesar de Souza Bastos Junior, MSC, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rua Aroazes 71/303, Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ, 22775-060, Brazil (e-mail: cesar.548@gmail.com).

J Coloproctol 2021;41(4):430–437.

### Abstract

**Introduction** Colorectal carcinoma (CRC) is the most common gastrointestinal neoplasm in the world, accounting for 15% of cancer-related deaths. This condition is related to different molecular pathways, among them the recently described serrated pathway, whose characteristic entities, serrated lesions, have undergone important changes in their names and diagnostic criteria in the past thirty years. The multiplicity of denominations and criteria over the last years may be responsible for the low interobserver concordance (IOC) described in the literature.

**Objectives** The present study aims to describe the evolution in classification of serrated lesions, based on the last three publications of the World Health Organization (WHO) and the reproducibility of these criteria by pathologists, based on the evaluation of the IOC.

**Methods** A search was conducted in the PubMed, ResearchGate and Portal Capes databases, with the following terms: *sessile serrated lesion*; *serrated lesions*; *serrated adenoma*; *interobserver concordance*; and *reproducibility*. Articles published since 1990 were researched.

**Results and Discussion** The classification of serrated lesions in the past thirty years showed different denominations and diagnostic criteria. The reproducibility and IOC of these criteria in the literature, based on the kappa coefficient, varied in most studies, from very poor to moderate.

**Conclusions** Interobserver concordance and the reproducibility of microscopic criteria may represent a limitation for the diagnosis and appropriate management of these lesions. It is necessary to investigate diagnostic tools to improve the performance of the pathologist's evaluation, for better concordance, and, consequently, adequate diagnosis and treatment.

### Keywords

- ▶ Sessile serrated lesion
- ▶ serrated lesions
- ▶ serrated adenoma
- ▶ interobserver concordance
- ▶ reproducibility

### Introduction

Colorectal carcinoma (CRC) is the most common gastrointestinal malignancy in the world, with ~ 150,000 new cases

per year in the United States, ~ 52,000 deaths annually, and 15% of all cancer-related deaths.<sup>1</sup> The development of CRC is related to a combination of molecular events that include genetic and epigenetic abnormalities, traditionally



**PR-2**

**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

A Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa declara para os devidos fins, que

## **CÉSAR DE SOUZA BASTOS JÚNIOR**

portador(a) do Documento número 724503-3, expedido por SiMar / RJ, CPF 08180992756, data de nascimento 25/09/1979, natural do Rio de Janeiro/RJ, registrado(a) no Sistema Integrado de Gestão Acadêmica (SIGA), sob o número 118099381, no Programa de Pós-Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), nível Doutorado, desta Instituição de Ensino Superior, com atividades que totalizaram 450 horas no período entre 06/03/2018 e 17/12/2021, tendo defendido sua Tese em 17/12/2021, com o título "Contribuição de características morfológicas e imuno-histoquímicas para o diagnóstico de lesões serrilhadas colorretais.", sob a orientação do(a) Professor(a) VERA LUCIA NUNES PANNAIN, tendo a banca examinadora considerado o(a) aluno(a) APROVADO(A) e outorgando-lhe a certificação correspondente.

31 de Janeiro de 2023 , emitido às 13:14h

**Bruno Lourenço Diaz**

Superintendente Acadêmico de Pós-Graduação

Código de autenticação:

**ABAF.7DF0.7347.802F.50E4.69DF.E730.C052**

Versão da chave: 1.0

Este código pode ser validado em: <https://gnosys.ufrj.br/Documentos/autenticacao>

## ANEXO U

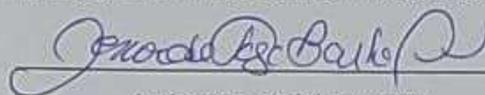
TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA A PUBLICAÇÃO ELETRÔNICA  
 NA REDE DE BIBLIOTECAS INTEGRADAS DA MARINHA (REDE BIM) E NO  
 REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA MARINHA (RI-MB)

## ATO DE AUTORIZAÇÃO

De acordo com a Lei nº 9610/1998, na qualidade de titular dos direitos de autor(a) da produção científica de que trata este Termo, autorizo a Marinha do Brasil a publicá-la na Rede BIM e no RI-MB, no formato PDF, disponível na Internet, sem ressarcimento dos direitos autorais, conforme permissões assinaladas no ato do depósito em Biblioteca da Rede BIM, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, devendo ser atribuída a autoria e vedado o uso comercial, a título de manutenção da gestão da produção científica da Marinha do Brasil.

RIO DE JANEIRO

31/01/2023



Local

Data

Assinatura do(a) autor(a)

## 1. Dados do(a) autor(a)

Nome completo: CESAR DE SOUZA BASTOS JUNIOR

NIP: 03 0337-24 CPF: 081809927-56 Telefone: (21) 998299600

E-mail: cesar\_souza@marinha.mil.br

## 2. Dados do material bibliográfico impresso e/ou eletrônico

Instituição de Ensino:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ)

Programa de Pós-graduação:

DOUTORADO EM MEDICINA - ÁREA ANATOMIA PATOLÓGICA

 Produção Científica:  Tese  Dissertação  Monografia/TCC  Livro  Cap. de livro  Artigo  
 Relatório de Estágio

## 3. Do acesso ao documento

Acesso ao público:  Total  Parcial – somente metadados

Em caso de autorização de acesso parcial, especifique:

 Material sigiloso Intangível (patente ou *software*), a ser disponibilizado a partir de: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Informações complementares:

## 4. Identificação do documento

Título: Contribuição de Características Morfológicas e Imuno-histoquímicas para o

Nº folhas: 142 folhas Anexos:  Sim  Não digitado de Cesar Semilha

Área de Conhecimento de acordo com a DGPM-305 e três (03) palavras-chaves: do Colômetas

 Q-6 (MEDICINA) Lesões semelhantes; Coloproctologia;  
 Adenocarcinoma de cólon; Adenome semelhante

Obs.: Preencher este Termo em duas vias, uma para a Biblioteca da Rede BIM; e outra a ser entregue após a assinatura do recibo de entrega pela Biblioteca, para a OMOT do curso/estágio.

## RECIBO DE ENTREGA NA BIBLIOTECA

(IDENTIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA)

Local

Data

Assinatura e Carimbo