



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Margel Pivetta Cantarelli

**Expressão de p16^{INK4A}/ki-67 e escore imunohistoquímico (IHQ-score) em
lesões cervicais tipo NIC 2**

Florianópolis

2023

Margel Pivetta Cantarelli

Expressão de p16^{INK4A}/ki-67 e escore imunohistoquímico (IHQ-score) em lesões cervicais tipo NIC 2

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Sherley Casimiro Onofre

Florianópolis

2023

Cantarelli, Margel Pivetta
Expressão de p16INK4A/ki-67 e escore imunohistoquímico
(IHQ-score) em lesões cervicais tipo NIC 2 / Margel
Pivetta Cantarelli ; orientador, Alexandre Sherlley
Casimiro Onofre, 2023.
45 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas. 2. cancer cervical. 3. ki-67. 4.
p16. I. Onofre, Alexandre Sherlley Casimiro . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

Margel Pivetta Cantarelli

Expressão de p16^{INK4A}/ki-67 e escore imunohistoquímico (IHQ-score) em lesões cervicais tipo NIC 2

O presente projeto em nível de Mestrado foi avaliado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Karoline Bunn Borba
Universidade Federal de Santa Catarina

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre
Orientador

Florianópolis, 2023

A todos que acreditam em pesquisa, em ciência e em medicina baseada em evidências.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, por toda a confiança e auxílio. Aos colegas que fizeram viável o trabalho. Agradeço aos meus pais, professores que são, e que sempre me inspiraram. Ao meu marido, que me apoia nas principais dificuldades. Ao meu filho, que faz parte do futuro e que pode perpetuar e contribuir para a ciência.

RESUMO

Objetivo: Estudar a expressão de p16^{INK4a}/Ki-67 e um escore imunohistoquímico (IHQ-score) em amostras de NIC 2 em pacientes menores de 30 anos e correlacionar esses dados com a histologia por CAF, genotipagem de HPV e citometria de DNA. **Métodos:** A coloração imuno-histoquímica foi realizada com anti-Ki67 e anti-p16^{ink4a} em amostras de pacientes menores de 30 anos com exame de Papanicolaou alterado e NIC 2 na biópsia. **Resultados:** De 254 mulheres estudadas; 29 pacientes receberam NIC 2 por análise de biópsia. Entre as amostras NIC 2, 18 (62,1%) foram submetidas à CAF. Este tratamento confirmou 8 amostras como NIC 2, 2 amostras sem lesão residual, 6 amostras como NIC 3 e 2 amostras contendo carcinoma espinocelular. 27 amostras foram viáveis para análise imuno-histoquímica. Nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre o marcador Ki-67 e o HPV 16 [$\chi^2(2)$ 3,258; $p = 0,24$], bem como não foi observada associação significativa entre p16^{INK4a} [$\chi^2(2)$ 2,521; $p = 0,31$]. Em relação à citometria de DNA, os resultados não revelaram diferenças significativas entre Ki-67 [$\chi^2(3)$ 2,505; $p = 0,56$], além de não indicar diferenças significativas entre p16^{INK4a} [$\chi^2(3)$ 3,639; $p = 0,33$]. Não houve significância estatística entre as variáveis das categorias CAF [$\chi^2(12)$ 10,495; $p = 0,97$] e escore imuno-histoquímico (soma dos escores de p16^{INK4a}/Ki-67). **Conclusão:** Não foram observadas diferenças significativas na comparação de p16^{INK4a}/Ki-67 com biópsia, genotipagem de HPV e citometria de DNA em pacientes com lesões de NIC 2.

Palavras-chave: p16; ki-67; câncer cervical.

ABSTRACT

Objective: Study the expression of p16^{INK4a}/Ki-67 and an immunohistochemical score (IHQ-score) in CIN 2+ samples in patients under 30 years old and correlate these data with histology by LEETZ, HPV genotyping and DNA-cytometry. **Methods:** Immunohistochemical staining was performed using anti-Ki67 and anti-p16ink4a in samples from patients under 30 years old with abnormal Pap test and CIN 2+ in biopsy. **Results:** From 254 women studied; 29 patients received CIN 2+ by biopsy analysis. Among CIN2+ samples, 18 (62.1%) underwent LEETZ. This treatment confirmed 8 samples as CIN 2+, 2 samples without residual lesion, 6 samples as CIN 3+ and 2 samples containing squamous cell carcinoma. 27 samples were viable to immunohistochemistry analysis. No statistically significant association was found between Ki-67 marker and HPV 16 [$\chi^2(2)$ 3.258; $p = 0.24$], as well as no significant association was observed between p16^{INK4a} [$\chi^2(2)$ 2.521; $p = 0.31$]. Regarding DNA-cytometry, results revealed no significant differences between Ki-67 [$\chi^2(3)$ 2.505; $p = 0.56$], as well as indicating no significant differences between p16^{INK4a} [$\chi^2(3)$ 3.639; $p = 0.33$]. No statistical significance between variables of LEETZ categories [$\chi^2(12)$ 10.495; $p = 0.97$] and immunohistochemical score (sum of scores of p16^{INK4a}/Ki-67). **Conclusion:** No significant differences were observed when comparing p16^{INK4a}/Ki-67 with biopsy, HPV genotyping and DNA-cytometry in patients with CIN 2+ lesions.

Keywords: p16; ki-67; cervical cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Seleção da amostra	20
Figura 2 — Infecções sexualmente transmissíveis reportadas pelas pacientes.....	25
Figura 3 — Frequência relativa dos resultados do tratamento por meio da CAF.....	26
Figura 4 — Padrão de análise de uma das amostras e sua correspondente coloração para p16 ^{INK4a} e ki-67, com aumento de 10x.....	28
Figura 5 — Pontuação da imunocoloração de p16 ^{INK4a} e Ki-67.....	29
Figura 6 — Proposta de Fluxograma para auxiliar na decisão clínica quanto a tratamento excisional ou conservador.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Genotipagem para HPV e ploidia do DNA das amostras analisadas.....	26
Tabela 2 — Presença do marcador Ki-67 nas diferentes partes do tecido epitelial da amostra estudada.....	30
Tabela 3 — Presença e ausência do marcador p16 nas diferentes partes do tecido epitelial da amostra estudada.....	30
Tabela 4 — Relação entre os marcadores Ki-67, p16 e HPV 16.....	31
Tabela 5 — Relação entre os marcadores Ki-67 e p16 e procedimento adotado para detecção de lesões.....	31
Tabela 6 — Relação entre os marcadores Ki-67 e p 16 e resultados da ploidia do DNA.....	32
Tabela 7 — Relação entre o somatório dos escores Ki-67 e p16 e os resultados do tratamento por meio da CAF.....	33

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AGC	Atipia das células glandulares
ASC-H	Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau
ASC-US	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
CBL	Citologia em base líquida
CEC	Carcinoma de células escamosas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIS	Carcinoma in situ
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESACP	European Society for Analytical Cellular Pathology
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
HU-UFSC	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
IFCPC	Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia
IHQ-score	Escore imuno-histoquímico
IST	Infecções sexualmente transmissíveis
LAST	Lower Anogenital Squamous Terminology
LLETZ	Excisão em Alça Grande da Zona de Transformação
LIEAG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
SIL	Lesão intraepitelial escamosa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PTGI	Patologia do Trato Genital Inferior
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
ZT	Zona de transformação

SUMÁRIO

F

1. DISSERTAÇÃO	12
1.1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.2. OBJETIVOS	18
1.2.1. OBJETIVO GERAL	18
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
1.3.1. POPULAÇÃO DO ESTUDO	18
1.3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	19
1.3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	19
1.3.4. COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS	20
1.3.4.1. Coleta e processamento dos dados do estudo atual	20
1.3.4.2. Coleta e processamento dos dados do estudo base	20
1.3.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA	21
1.3.6. PROCEDIMENTO DE TRABALHO	22
1.3.6.1. Pontuação de p16^{INK4a}	22
1.3.6.2. Pontuação de Ki-67	22
1.3.6.3. Escore Imuno-histoquímico (IHQ-score)	23
1.3.7. PROCESSAMENTO DE DADOS PRÉVIOS	23
1.3.7.1. Citometria de DNA	23
1.3.7.2. Teste de HPV - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	23
1.3.7.3. Genotipagem	24
1.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
1.4. RESULTADOS	24
1.5. DISCUSSÃO	34
1.6. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	43
APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM HUMANOS	43

1. DISSERTAÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O câncer é um problema de saúde pública mundial, especialmente em países subdesenvolvidos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2022; PARKIN et al., 2002). No Brasil, o câncer de colo uterino é a terceira localização primária de incidência e de mortalidade por câncer em mulheres, sem considerar tumores de pele não melanoma (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2022). Para o ano de 2023 a 2025 são estimados 17 mil casos novos de câncer cervical, o que equivale a 4,7% dos cânceres. A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2020, estimou 604.607 novos casos de câncer de colo uterino e óbito de 341.831 mulheres acometidas com a doença, o que representa em torno de 7% dos casos de óbito por câncer no mundo (SUNG et al., 2021).

Sabe-se que a presença do Papilomavírus Humano (HPV) é causa necessária para o desenvolvimento de câncer de colo uterino. A relação entre o HPV e o câncer de colo uterino está bem estabelecida. Na década de 1990, com o advento da clonagem molecular, estudos multicêntricos confirmaram a presença do Ácido desoxirribonucleico (DNA) do HPV em quase 100% dos epitélios dos carcinomas invasivos. A infecção persistente por um ou mais dos tipos oncogênicos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), é uma causa necessária para a neoplasia cervical e seus precursores (BURD, 2003; CASTELLSAGUÉ, 2008; MOODY; LAIMINS, 2010; ZUR HAUSEN, 2002). No entanto, enquanto programas de vacinação forem ainda heterogêneos mundialmente e sua adesão não alcançar alvo, necessitam-se melhores formas de rastrear essas pacientes e identificar quais delas realmente tratar (CLARO; DE LIMA; DE ALMEIDA, 2021).

O método de rastreamento do câncer do colo do útero no Brasil é o exame citopatológico (exame de Papanicolaou), que deve ser oferecido às mulheres com idade entre 25 e 64 anos e que já tiveram atividade sexual. A rotina recomendada para o rastreamento no Brasil é a repetição do exame Papanicolaou a cada três anos, após dois exames normais consecutivos realizados com um intervalo de um ano

(MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2022).

A priorização desta faixa etária como a população-alvo do programa justifica-se por ser a de maior ocorrência das lesões de alto grau, passíveis de serem tratadas efetivamente para não evoluírem para o câncer. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência deste câncer aumenta nas mulheres entre 30 e 39 anos de idade e atinge seu pico na quinta ou sexta décadas de vida. Antes dos 25 anos prevalecem as infecções por HPV e as lesões de baixo grau, que regredirão espontaneamente na maioria dos casos e, portanto, podem ser apenas acompanhadas conforme recomendações clínicas. Após os 65 anos, por outro lado, se a mulher tiver realizado os exames preventivos regularmente, com resultados normais, o risco de desenvolvimento do câncer cervical é reduzido dada a sua lenta evolução (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Segundo o Ministério da Saúde, caso o rastreamento citológico seja positivo, deve-se realizar o encaminhamento para colposcopia ou repetir o exame em determinado período, a depender do grau da lesão. A citologia mostrou-se um exame de alta especificidade, enquanto a colposcopia apresentou alta sensibilidade. A associação de colposcopia ao rastreamento feito pela citologia, em pacientes selecionadas, aumenta muito a acurácia do diagnóstico das lesões precursoras do carcinoma do colo uterino (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2019).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as estratégias para a detecção precoce são o diagnóstico precoce (abordagem de pessoas com sinais e/ou sintomas da doença) e o rastreamento (aplicação de um teste ou exame numa população assintomática, aparentemente saudável, com objetivo de identificar lesões precursoras do câncer e encaminhá-la para investigação e tratamento). O teste utilizado em rastreamento deve ser seguro, relativamente barato e de fácil aceitação pela população, ter sensibilidade e especificidade comprovadas, além de relação custo-efetividade favorável (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2021).

Desde o surgimento do exame citopatológico de Papanicolaou várias nomenclaturas já foram utilizadas para descrever e padronizar os achados citopatológicos dos precursores do câncer cervical.

Em 1950 foi introduzido o termo displasia, em que havia atipia do epitélio cervical. A displasia poderia ser leve, moderada e grave, dependendo do grau de acometimento da espessura do epitélio (REAGAN; HICKS, 1953). Durante muitos anos, as lesões foram indicadas por displasia e Carcinoma in situ (CIS). A observação de que alguns casos progrediam e outros muitas vezes regrediam levaram ao conceito da história natural do câncer de colo e foram feitas modificações nas nomenclaturas.

Em 1968 o termo Neoplastia Intra-epitelial Cervical (NIC) foi introduzido para indicar as diferentes atipias celulares limitada ao epitélio (RICHARD, 1967). A NIC é uma classificação histológica e é categorizada em graus 1, 2 e 3 dependendo da proporção acometida do epitélio atípico. Nesse conceito, as neoplasias invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase de doença pré-invasiva, e os graus mais avançados de NIC (2 e 3) apresentam uma maior proporção da espessura do epitélio atípico composto de células indiferenciadas e, devido à sua maior probabilidade de progressão para o câncer, se deixadas sem tratamento, são consideradas seus reais precursores (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003).

Alterações como atipia coilocítica ou condilomatosa associada a infecção pelo HPV foram cada vez mais identificadas a partir da classificação inicial de 1968. Coilócitos são células atípicas com uma cavitação ou auréola perinuclear no citoplasma, devido a infecção pelo HPV. Assim, nos anos 1980 foi proposta uma nova terminologia baseada em dois graus de doença: NIC de baixo grau, que compreendia anomalias compatíveis com atipia coilocítica e lesões tipo NIC 1; e NIC de alto grau (que compreendia NIC 2 e 3)(SELLORS, 2003).

Em 1988 foi realizada a primeira de uma série de conferências em Bethesda, em Maryland (EUA), para desenvolver uma nova nomenclatura descritiva dos achados da citologia ginecológica, surgindo então a Nomenclatura de Bethesda (SOLOMAN, 1989). A série de conferências surgiu em virtude de muitos conflitos, devidos a diagnósticos citopatológicos discordantes dos achados histológicos.

A característica principal do Sistema de Bethesda foi a criação do termo lesão intraepitelial escamosa (SIL) e um esquema de dois graus que compreendia lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL). A classificação de Bethesda classifica as alterações condilomatosas (HPV) planas e NIC de baixo grau (NIC 1) em LSIL, enquanto a HSIL compreende NIC mais avançada, como NIC 2 e 3. Esta divisão binária tem importante significado na clínica, já que os casos de HSILs devem ser

confirmados histologicamente e normalmente tratados, enquanto os casos de LSIL podem ser seguidos através da citologia e colposcopia. (SOLOMON et al., 2002)

Uma terceira categoria, atípicas das células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H) é utilizado para classificar alterações celulares que não satisfazem os critérios para as categorias LSIL ou HSIL. (BOLLMANN et al., 2001; SOLOMON et al., 2002)

A Nomenclatura de Bethesda foi submetida a revisões em 1991 (LUFF et al., 1992), 2001 (SOLOMON et al., 2002) e 2014 (NAYAR; WILBUR, 2015). A nomenclatura brasileira utilizada para laudos citopatológicos também passa por constantes alterações. A adoção do Sistema de Bethesda, ainda que adaptado ao Brasil, facilitou a comparação de resultados nacionais com os encontrados em publicações estrangeiras (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2022).

A distinção entre LSIL (NIC 1) e HSIL (NIC 2/3) é muito importante para as decisões do tratamento. Em geral, exceto em pacientes abaixo dos 24 anos, recomenda-se observação para as lesões do tipo NIC 1 e excisão para NIC 2/3. Essas recomendações baseiam-se no risco aumentado de persistência e progressão para carcinoma invasivo associado a lesões de alto grau (MANIAR et al., 2015). O comportamento biológico da neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC 2 e 3) não pode atualmente ser previsto com segurança em uma única paciente. O problema é composto pelo fato de que o risco estimado de progressão da doença em diferentes grupos mostra marcante variação. Um fato importante demonstrado é que o tratamento de lesões precursoras do câncer do colo em adolescentes e mulheres jovens está associado ao aumento da morbidade obstétrica e neonatal, como parto prematuro (KYRGIU et al., 2006). Portanto, reduzir as intervenções no colo do útero em mulheres jovens se justifica, tendo em vista que a maioria delas não tem prole definida. Principalmente quando se trata de lesões intermediárias, como a NIC 2, que tem causado muitos dilemas terapêuticos, pois podem conter tanto lesões progressivas como autolimitadas.

Em 2012, o Colégio Americano de Patologia e a Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical publicaram o LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology), uma recomendação histopatológica para o trato genital inferior. Com

base na baixa reprodutibilidade e falta de evidências que a NIC 2 seja uma entidade biológica distinta recomendam mudanças para um sistema de nomenclatura com 2 categorias, as lesões intraepiteliais de baixo grau (infecções transitórias) e as lesões de alto grau (lesões pré-câncer). Para determinar o comportamento das lesões intermediárias (NIC 2) foi utilizado o p16, em que uma coloração forte e difusa indica ser uma lesão de alto grau e do contrário indica lesão de baixo grau ou lesão não associada ao HPV, evitando assim o tratamento excessivo dessa paciente. No entanto, apesar de promissor, persistem casos de p16 negativos associados à progressão para lesão de alto grau e os estudos ainda têm demonstrado resultados variados. (MANIAR et al., 2015). O uso de outros parâmetros associados, tais como o conteúdo de DNA nuclear, hibridização in situ por fluorescência, imunohistoquímica, AgNOR e teste de HPV merecem atenção (BIBBO et al., 1985; BOLLMANN et al., 2001; NASIELL; NÄSLUND; AUER, 1984).

Para melhorar a eficiência dos sistemas de diagnóstico precoce do câncer cervical, além do uso de testes de captura híbrida de HPV e genotipagem, tem sido proposto o uso de marcadores celulares e virais para a identificação de lesões pré-cancerosas com maior probabilidade de evolução para câncer. Várias proteínas celulares e marcadores de dano oxidativo ao DNA foram sugeridos como possíveis biomarcadores de carcinogênese cervical, como o p16INK4a, Ki-67, CyclinE1, TOP2A / MCM2 e telomerase, dentre outros. (DEL MORAL-HERNÁNDEZ et al., 2021).

Outro método estudado como biomarcador de prognóstico é a citometria de DNA (DNA-ICM) do HPV. A citometria do DNA detecta aneuploidia do cromossoma. A integração do HPV ao DNA celular gera instabilidade, originando essa alteração denominada aneuploidia (DANIELSEN; PRADHAN; NOVELLI, 2016). Esta última pode ser encontrada em lesões cervicais com maior probabilidade de transformação maligna, assim como em outros tumores de origem epitelial (GIAM; RANCATI, 2015). A DNA-ICM, envolvida em estudos experimentais desde 1960, (WONG et al., 2018) e de baixo custo comparado aos demais biomarcadores, tem sido citada como método para avaliação clínica de tumores sólidos, como câncer cervical e seus precursores (GIAM; RANCATI, 2015). Em um estudo recente do nosso grupo mostrou que o rastreamento do colo do útero poderia ser melhorado pela incorporação do DNA-ICM como método complementar ao rastreio primário para identificar quais as mulheres que necessitam de um acompanhamento mais próximo (COSTA et al., 2021).

Diante dos biomarcadores disponíveis ganham destaque para auxílio diagnóstico no rastreamento do câncer de colo uterino o p16INKa e o Ki-67. O p16INKa é uma proteína supressora tumoral que inibe CDK4 e CDK6. Em células epiteliais diferenciadas, a expressão p16INK4a não é detectada. Já nas células epiteliais cervicais displásicas e HPV-positivas, p16INK4a é superexpresso (KOTAKE et al., 2015). O ki-67 é um marcador de proliferação celular que só é expresso em células em crescimento (DEL MORAL-HERNÁNDEZ et al., 2021). Em estudos recentes estes biomarcadores foram superexpressos em amostras com infecção por HPV de alto risco, e os níveis de expressão aumentaram com a gravidade da lesão. (DEL MORAL-HERNÁNDEZ et al., 2021) (EL-ZEIN et al., 2021). Além disso, estudos mostram que o p16/Ki-67 têm uma boa performance para testes de triagem (GIOGI ROSSI et al., 2020) e podem reduzir em até 75% colposcopias desnecessárias quando associados ao rastreio citológico (TORRES-IBARRA et al., 2020).

O uso do p16INK4a vem sendo utilizado como instrumento de auxílio diagnóstico para patologistas, principalmente em lesões intermediárias do tipo NIC 2. No entanto, apesar de promissor, persistem casos de p16 negativos associados à progressão para lesão de alto grau e os estudos ainda têm demonstrado resultados variados.

Zummeren e colaboradores em 2018 publicaram uma proposta de escore imunológico de pontuação de três níveis para ki-67 e p16. Nesse escore, cada marcador é graduado de 0 a 3, sendo 0 a ausência de acometimento na mostra e podendo variar de 1 a 3 dependendo do grau de acometimento do marcador na amostra, sendo 3 o acometimento máximo. Segundo os autores, o somatório dos escores dos dois marcadores, resultou em uma maior precisão e reprodutibilidade. Isso poderia abrir a possibilidade de uma definição mais padronizada e reprodutível do grau de NIC do que a prática patológica convencional, permitindo uso de novos biomarcadores para melhorar a compreensão da progressão das lesões precursoras da infecção pelo papilomavírus humano ao câncer. Nesse estudo, que avaliou 115 amostras de tecido cervical, o imune score com definição de positividade máxima (escore máximo=6) produziu a maior proporção de testes positivos para *NIC3* (95,5%), em combinação com a menor proporção de testes positivos em amostras com *NIC1* (1,8%). Esses dados sugerem que o uso do imune score poderia auxiliar

na avaliação das amostras cujo diagnóstico inicial sugere NIC 2 e que possam se comportar com comportamento mais agressivo (VAN ZUMMEREN et al., 2018).

Diante do cenário, este trabalho tem como objetivo principal avaliar a positividade através de um escore imuno-histoquímico (IHQ-score) dos anticorpos anti-Ki67 e anti-p16ink4a em lesões do colo do útero do tipo NIC 2 em pacientes com idade menor ou igual a 30 anos e correlacionar esses dados com outros métodos, como a histologia (padrão ouro) e métodos adjuvantes, tais como a citometria de DNA e HPV.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a positividade através de um escore imuno-histoquímico (IHQ-score) dos anticorpos anti-Ki67 e anti-p16ink4a em lesões do colo do útero do tipo NIC 2 em pacientes com idade menor ou igual a 30 anos

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Mostrar o perfil epidemiológico da população estudada.
- b. Estudar a correlação dos dados de positividade dos anticorpos e IHQ-score com outros métodos, como a histologia (padrão ouro) e métodos adjuvantes, tais como a citometria de DNA e HPV.

1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1. POPULAÇÃO DO ESTUDO

Neste estudo transversal retrospectivo, foram selecionadas amostras de biópsia cervical fixadas em formalina e embebidas em parafina e amostras de excisão em alça grande da zona de transformação (LLETZ) ou Cirurgia de Alta Frequência (CAF) dos arquivos da Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica do HU-UFSC/EBSERH.

Foram realizadas análise imuno-histoquímica utilizando o anti-Ki67 e anti-p16ink4a das amostras de pacientes previamente coletadas e armazenadas, conforme o estudo prospectivo transversal de *Pogere* e colaboradores (POGERE, 2020).

O estudo principal, *Pogere* (POGERE, 2020), teve como alvo mulheres que foram atendidas no ambulatório de ginecologia e colposcopia do Hospital Universitário da UFSC, que apresentaram alterações citológicas na colpocitologia oncótica. A coleta do material foi realizada de julho de 2016 a abril de 2019, totalizando 254 mulheres.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HU-UFSC. Toda paciente que se enquadrou nos critérios de inclusão foi previamente convidada a participar do estudo e informada acerca da pesquisa. Aquelas que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e posteriormente, responderam a um questionário (anexo). Ao assinar o TCLE, os resultados laboratoriais e clínicos rotineiramente realizados foram obtidos e incluídos na pesquisa.

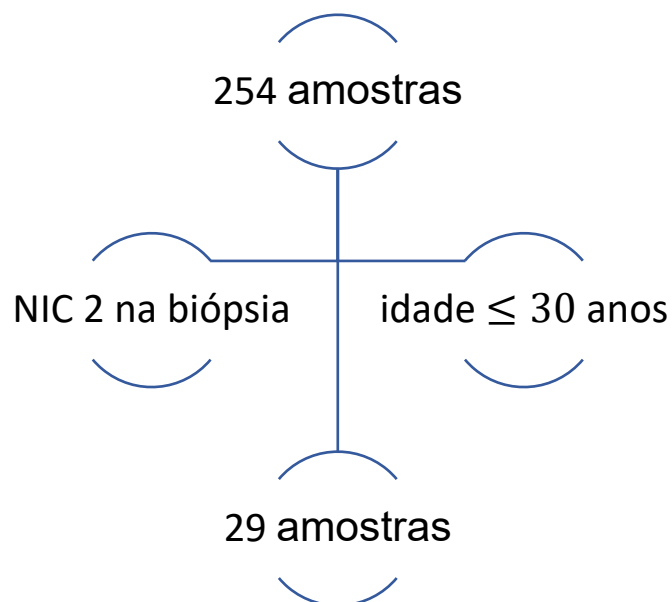
1.3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Amostras de pacientes que apresentaram NIC 2 na biópsia realizada e que tinham idade menor ou igual a 30 anos. As amostras que diferiram de NIC 2 ou pacientes maiores de 30 anos foram excluídos do estudo. A definição dos critérios de inclusão partiu da hipótese principal do estudo: avaliar os marcadores p16 e ki-67 para auxílio diagnóstico e terapêutico na faixa etárias que mais há dúvida clínica, antes dos 30 anos.

1.3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Amostras de pacientes do estudo principal cuja histologia da biópsia fosse diferente de NIC 2 ou pacientes com idade maior de 30 anos.

Figura 1 — Seleção da amostra



Fonte: elaborado pela autora (2023)

1.3.4. COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS

1.3.4.1. Coleta e processamento dos dados do estudo atual

Os blocos e biópsias das 29 pacientes cujo diagnóstico foi de NIC 2 foram separados para análise. Foram selecionados um bloco de cada paciente que continha a lesão mais representativa, pois havia mais de uma amostra em algumas pacientes. Foram montadas lâminas com o bloco selecionado para cada paciente. Para realizar a análise utilizou-se material da cirurgia de alta frequência (CAF), exceto quando havia somente amostra de biópsia (por motivo de tratamento conservador). Procedeu-se a avaliação imuno-histoquímica de cada marcador.

1.3.4.2. Coleta e processamento dos dados do estudo base

A coleta e processamento de dados principais já havia sido realizada por POGERE e colaboradores (POGERE, 2020). As mulheres selecionadas foram submetidas a exame ginecológico e colposcopia. No momento do exame foram coletadas amostras citológicas com espátula de Ayre e escova endocervical para a

execução de citologia em base líquida. As amostras foram armazenadas em solução PreservCyt® Thinprep e posteriormente processadas em citocentrífuga para confecção das lâminas. Foram confeccionadas lâminas para exame de Papanicolaou, análise de DNA. O material armazenado em solução PreservCyt® Thinprep foi utilizado também para o teste de HPV por PCR.

Foi realizada biópsia nas lesões evidenciadas na colposcopia como é feito na rotina de acordo com o estabelecido pelo Ministério da Saúde. O exame histopatológico foi realizado rotineiramente pelo setor de patologia do HU-UFSC.

O laudo colposcópico utilizou a terminologia da IFCPC (International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy) – Rio de Janeiro 2011.

Todos os dados acima, já previamente processados e tabelados foram utilizados para comparação com o estudo imuno-histoquímico proposto neste trabalho.

1.3.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cortes histológicos de 3 µm foram obtidos em lâminas TOMO® (Matsunami OSAKA, Japan) e colocadas em estufa a 50°C por 1h. As reações de imuno-histoquímica semiautomatizadas foram realizadas na plataforma Benchmark XT da marca VENTANA/Roche. A desparafinação das amostras ocorreu no protocolo padrão do equipamento utilizando o reagente EZ Prep Concentrate (Ventana, Roche, Arizona, USA). O protocolo da reação para ambos os anticorpos primários Ki-67, clone SP6 (Cell Marque) e p16^{INK4A}, clone JC2 (Cell Marque) foi reativação antigênica com tampão alcalino Cell Conditioning Solution (CC1) (Ventana, Roche, Arizona, USA) por 1h, seguido de incubação com anticorpo primário de acordo com o protocolo de cada um (Ki-67 ou p16) por 1h a 37°C. Os anticorpos foram diluídos com o reagente Antibody Diluent (Ventana, Roche, Arizona, USA) na diluição de 1:500 para o Ki-67 e de 1:100 para o p16.

Foi utilizado o kit *ultra* View Universal DAB Detection Kit (Ventana, Roche, Arizona, USA) para detecção dos epítomos antigênicos.

Após retirada do equipamento as amostras foram lavadas em água corrente com detergente neutro a fim de eliminar resquícios do reagente LCS (predilut)

(Ventana, Roche, Arizona, USA), utilizado como “cover slip” em todas as etapas das reações para evitar evaporação dos reagentes. A contra coloração com Hematoxilina de Harris (Sigma Aldrich, USA), foi realizada manualmente por 30s e posteriormente foi realizada a desidratação progressiva das amostras com etanol 50%, 80% e 100%, diafanização em xilol e montagem das lâminas com *Entellan* (Sigma Aldrich, Canadá).

Todas as lâminas continham além do tecido estudado um controle positivo previamente especificado na bula de cada anticorpo. A técnica foi realizada na Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica HU-UFSC/EBSEH.

1.3.6. PROCEDIMENTO DE TRABALHO

Com os reações imuno-histoquímicas das 29 pacientes realizadas, duas patologistas experientes realizaram a imunopontuação dos marcadores ki-67 e p16 em uma planilha previamente elaborada pela autora, usando o sistema de pontuação sugerido por Zummeren e colaboradores (VAN ZUMMEREN et al., 2018).

1.3.6.1. Pontuação de p16^{INK4a}

A pontuação 0 foi definida como ausência de positividade para p16-ink4a ou células positivas focalmente dispersas ou pequenos aglomerados de células. A pontuação 1 foi definida como positividade difusa e de baixa intensidade restrita ao terço inferior do epitélio. A pontuação 2 foi definida como positividade contínua nos dois terços inferiores do epitélio. A pontuação 3 foi definida como células positivas envolvendo toda a espessura do epitélio.

1.3.6.2. Pontuação de Ki-67

A pontuação 0 foi considerada um padrão de coloração normal (ou seja, coloração de núcleos na camada basal. A pontuação 1 foi definida como núcleos positivos encontrados predominantemente no terço inferior do epitélio. A pontuação 2 foi definida como núcleos positivos encontrados predominantemente nos dois terços inferiores do epitélio. A pontuação 3 foi definida como núcleos positivos em mais de dois terços do epitélio.

1.3.6.3. Escore Imuno-histoquímico (IHQ-score)

Com o somatório dos escores de p16^{INK4a} (que variou de 0 a 3) e do escore de ki-67 (que variou de 0 a 3), procedeu-se a elaboração do escore imuno-histoquímico (IHQ score), que poderia variar de 0 a 6.

1.3.7. PROCESSAMENTO DE DADOS PRÉVIOS

A colposcopia, citologia em base líquida, citometria de DNA, teste de HPV e genotipagem já tinham sido realizados no projeto base. Foram utilizados os dados já previamente processados e tabelados para comparação e cruzamento com os dados atuais.

1.3.7.1. Citometria de DNA

Após análise citológica, as lamínulas das lâminas coradas por Papanicolaou foram removidas (imersão no xilol), para posterior coloração de Feulgen. A leitura das lâminas se deu de acordo com os princípios e diretrizes estabelecidas pelo quarto Consenso da European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) em Diagnóstico por Citometria de Imagem de DNA (HAROSKE et al., 2001).

Foram selecionadas no mínimo 30 células de referência (células intermediárias) para cada lâmina. O coeficiente de variação entre as células de referência não passou de 5% (BÖCKING; HUY NGUYEN, 2004). Mais de 300 células de análise para cada lâmina foram selecionadas, de forma geral, randomicamente. A interpretação dos resultados através dos complexos algoritmos preconizados pela ESACP foi realizada automaticamente pelo software da MotiCyte DNA Cytology Work Station (Motic®).

1.3.7.2. Teste de HPV - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para a amplificação do genoma do HPV foram utilizados os *primers* degenerados MY09/MY11 e os gerais GP5+/GP6+ que amplificam sequências de pares de base da região L1 do DNA do HPV (SMITH *et al.*, 2012; RIVERO, NUNES,

2006). Como controle positivo foi utilizado em todas as reações DNA de HPV extraído de células HeLa.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (Invitrogen) corado com *Gel Red*TM (BioLabs) sob 100v por 1 hora. O resultado foi visualizado em transiluminador sob iluminação ultra-violeta e as amostras positivas posteriormente encaminhadas para genotipagem.

1.3.7.3. Genotipagem

Para a genotipagem foi utilizada a técnica de *multiplex* PCR com *primers* específicos para os genótipos 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66. Os tipos virais detectados foram confirmados através de sequenciamento gênico.

1.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram inicialmente registrados em planilhas do Microsoft Excel® e, posteriormente, importados para o programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 23, para a execução das análises. Para avaliar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis numéricas foram resumidas por meio de medidas de tendência central (como média ou mediana) e medidas de variabilidade (como desvio padrão ou intervalo interquartil). As variáveis categóricas foram descritas por meio da frequência absoluta e da frequência relativa. O teste exato de Fisher foi empregado para examinar associação entre os marcadores Ki-67 e p 16 com o HPV 16 (negativo e positivo), método utilizado para detectar lesões (biópsia e CAF), e entre a ploidia do DNA (euploidia e aneuploidia). Foi estabelecido o nível de significância estatística de 5%.

1.4. RESULTADOS

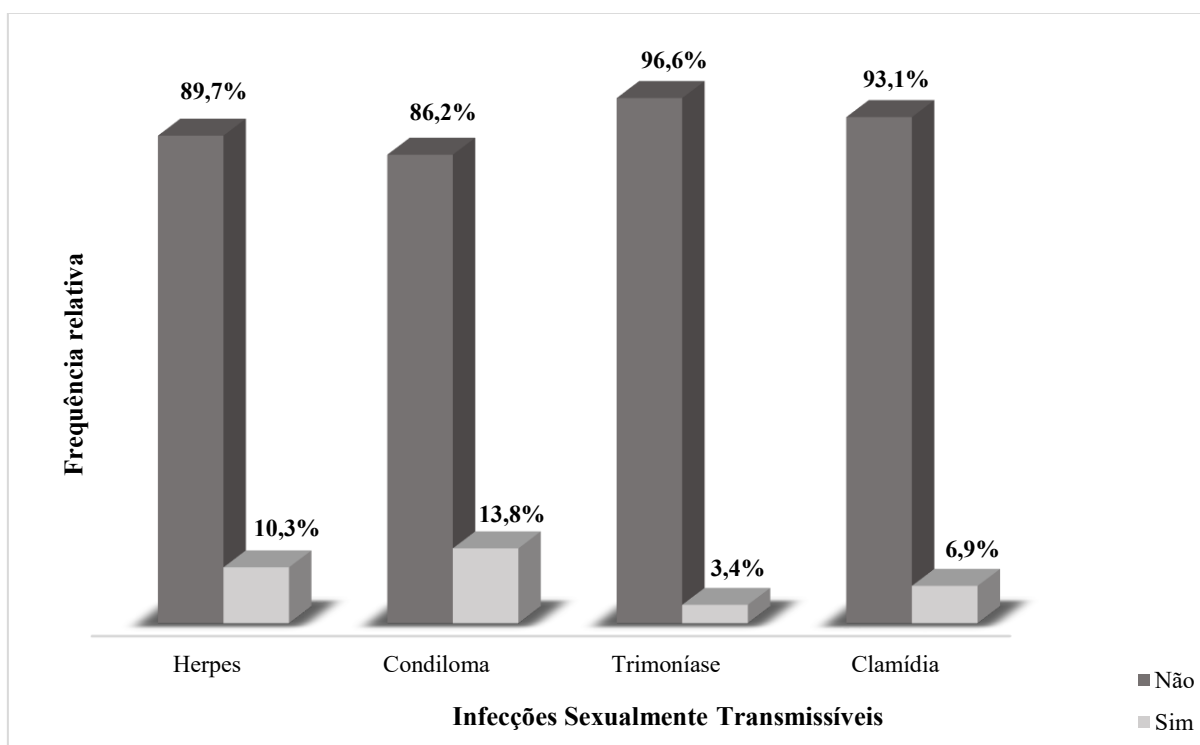
Neste estudo, do total de 254 mulheres estudadas, ao aplicar os critérios de elegibilidade, resultou-se na amostra de 29 pacientes cuja idade mínima registrada foi 18 e a máxima 30 anos com mediana de 24,0 (22,0 – 29,0). A escolaridade foi calculada em anos e a mediana foi 13,0 (12,0 – 16,0) variando de 12 a 16 em anos de

estudo. Vinte e três pacientes não eram tabagistas (79,3%), cinco (17,2%) declararam fazer uso do tabaco e uma (3,4%), ex-tabagista. Quinze (52%) eram solteiras, uma (3,4%) era casada, 11 (37,9%) viviam em união estável e duas (6,9%), divorciadas.

O início da atividade sexual das pacientes teve a idade mínima registrada de 13 e a máxima de 26 anos, sendo a mediana de 15,0 (14,5 – 17,0) anos. Vinte e seis (89,7%) não tinham sido vacinadas contra HPV, uma (3,4%) relatou ter sido vacinada antes do início da atividade sexual, enquanto duas (6,9%) narrou ser vacinada após.

A maioria das pacientes (89,7%) não fazia uso de preservativos ou usava as vezes e apenas três (10,3%) relataram que faziam uso. Vinte (69,0%) negaram sofrer de algum tipo de IST e nove (31,0%) relataram ter algum tipo de Infecção Sexualmente Transmissível (IST), as quais estão representadas graficamente na Figura 2.

.Figura 2— Infecções sexualmente transmissíveis reportadas pelas pacientes

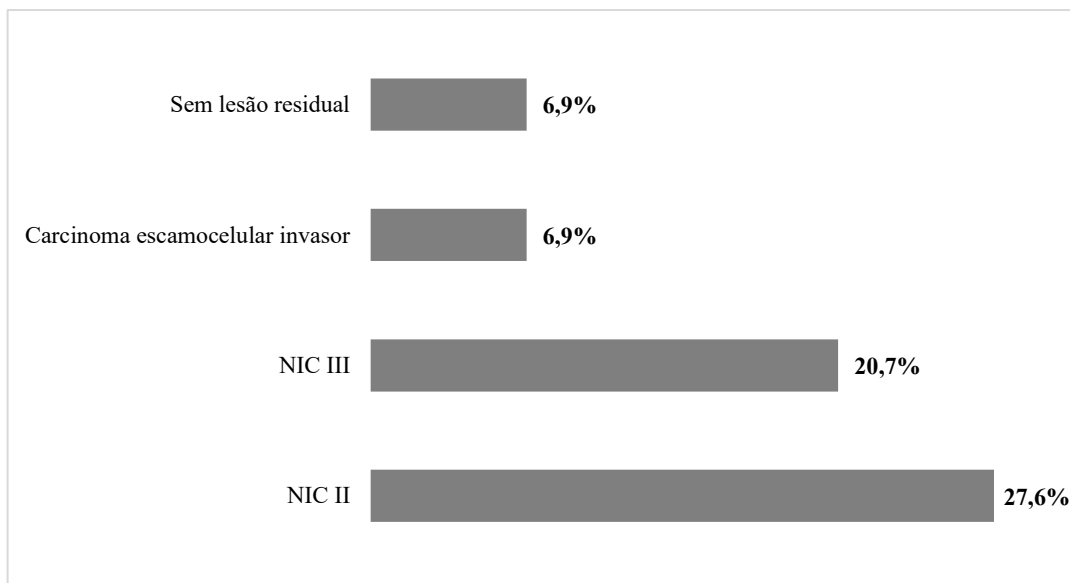


Fonte: elaborado pela autora (2023)

Oito (27,6%) participantes já tinham experimentado gestações anteriores que variaram de 1 a 4 e mediana de 1,0 (1,0 – 2,7). A idade na qual ocorreu a primeira gestação variou de 16 a 22 anos com mediana de 19,5 (18,0 – 21,7).

A histopatologia das amostras de biópsia revelou que todas estavam classificadas como NIC 2. Das 29 amostras, 18 (62,1%) foram submetidas à CAF. Este tratamento foi possível realizar a histologia que mostrou: oito amostras permaneceram classificadas como NIC 2; duas amostras não apresentavam lesão residual; seis foram classificadas como NIC 3; e outras duas amostras apresentaram carcinoma escamocelular invasor. A Figura 3 resume os achados citados acima.

Figura 3 — Frequência relativa dos resultados do tratamento por meio da CAF*



*CAF = Cirurgia de alta frequência

**NIC = Neoplasia Intracelular Cervical

Fonte: elaborado pela autora (2023)

Quanto à genotipagem para HPV, o teste molecular identificou a presença de HPV 16 em 48,3% e ausência do tipo HPV 18 em 86,2% nas amostras. A análise de ploidia do DNA não foi possível em apenas uma amostra (3,4%), pois o conteúdo foi considerado insatisfatório (Tabela 1).

Tabela 1 — Genotipagem para HPV* e ploidia do DNA** das amostras analisadas

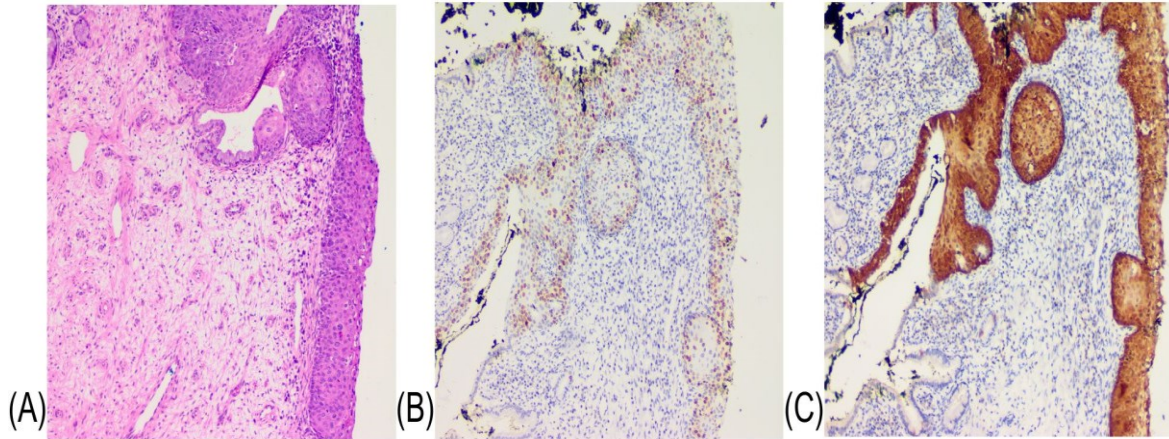
Tipo viral	n (%)
HPV 16	
Negativo	11 (37,9)
Positivo	14 (48,3)
Não realizado	4 (13,8)
HPV 18	
Negativo	25 (86,2)
Não realizado	4 (13,8)
Ploidia do DNA	
Euploidia	12 (41,4)
Aneuploidia	16 (55,2)
Não realizado (amostra 1nsatisfatória)	1 (3,4)

*HPV = *Human papillomavirus* **DNA: Ácido desoxirribonucleico

Fonte: elaborado pela autora (2023)

A análise da imuno-histoquímica considerou apenas 27 amostras viáveis para os dois marcadores estudados. Para assegurar a qualidade do resultado, duas amostras foram excluídas desta análise por não apresentarem condições adequadas. Exemplos de avaliação e montagem de lâminas pela coloração hematoxilina-eosina (HE), reações imuno-histoquímicas e seus escores p16^{INK4a} e ki-67 podem ser observados nas Figuras 4 e 5.

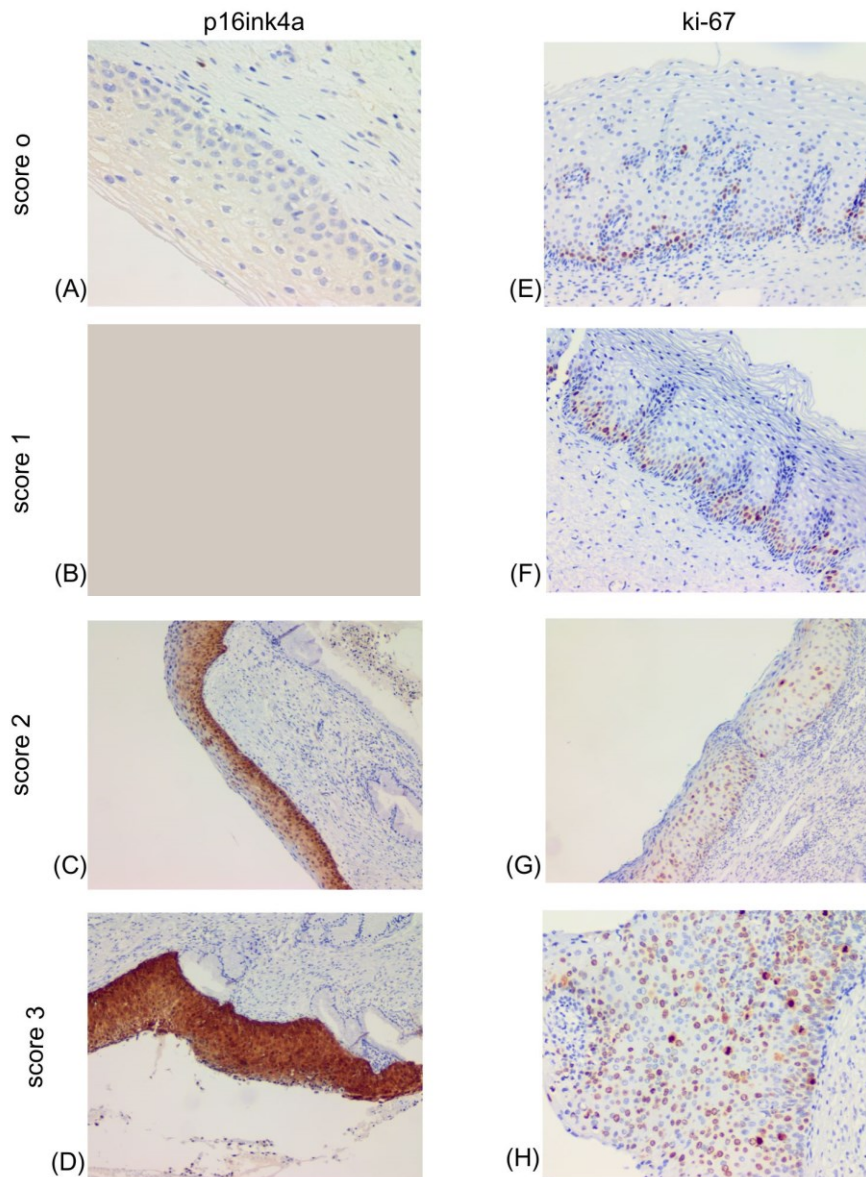
Figura 4 — Padrão de análise de uma das amostras e sua correspondente coloração para p16^{INK4a} e ki-67, com aumento de 10x.



(A) Lâmina mostrando lesão escamosa NIC2 em hematoxilina-eosina. (B) Coloração correspondente para ki-67 mostrando um núcleo positivo em mais de dois terços do epitélio classificado como pontuação 3. (C) Coloração correspondente para p16^{INK4a} mostrando positividade difusa envolvendo toda a espessura do epitélio classificada como pontuação 3.

Elaborado pela autora (2023)

Figura 5 — Pontuação da imunocoloração de p16^{INK4a} e Ki-67



A coloração nuclear de Ki-67 e de p16^{ink4a} do citoplasma no epitélio escamoso foi graduada. (A) Nenhuma positividade ou coloração irregular foi pontuada como score 0. (B) Positividade difusa no terço inferior do epitélio foi pontuada como score 1, mas esta pontuação não foi encontrada nas amostras do estudo. (C) Positividade difusa nos dois terços inferiores do epitélio foi pontuada como score 2. (D) A positividade difusa envolvendo toda a espessura do epitélio foi pontuada como score 3. (E) Os núcleos positivos na camada basal foram considerados um padrão de coloração normal e pontuados como score 0. (F) Os núcleos positivos predominantemente encontrados no terço inferior do epitélio foi pontuado como score 1. (G) Os núcleos positivos encontrados predominantemente nos dois terços inferiores do epitélio foi pontuado como score 2. (H) Os núcleos positivos em mais de dois terços do epitélio como score 3.

Elaborado pela autora (2023)

Para o marcador Ki-67, o resultado da análise revelou que em apenas 3,7% da amostra havia positividade com menos de 10% dos núcleos da camada basal, indicando baixa taxa de proliferação celular nessa região. Contudo, 8% da amostra apresentou positividade no terço inferior do epitélio; 9% apresentou positividade em dois terços inferiores do epitélio ; e 9% da amostra apresentou positividade em mais de dois terços do epitélio e estas informações estão descritas em detalhes na Tabela 2.

Tabela 2 — Presença do marcador Ki-67 nas diferentes partes do tecido epitelial da amostra estudada

Partes do tecido epitelial	n (%)
Núcleos da camada basal (<10%)	1 (3,7)
Núcleos no terço inferior do epitélio (10-30%)	8 (29,7)
Núcleos em dois terços inferiores do epitélio (30-70%)	9 (33,3)
Núcleos em mais de dois terços do epitélio (70%)	9 (33,3)

Fonte: elaborado pela autora (2023)

A análise utilizando o marcador p16 mostrou ausência do marcador na região epitelial em 7,4% da amostra. Porém, 2% sinalizou positividade difusa no terço inferior do epitélio, 6% positividade difusa nos dois terços inferiores do epitélio e 17% positividade difusa em mais de dois terços do epitélio. Os valores obtidos nas diferentes partes epiteliais estão relatados na Tabela 3.

Tabela 3 — Presença e ausência do marcador p16 nas diferentes partes do tecido epitelial da amostra estudada

Partes do tecido epitelial	n (%)
Negativo	2 (7,4)
Positivo - difuso no terço inferior do epitélio	2 (7,4)
Positivo - difuso nos dois terços inferiores do epitélio	6 (22,2)
Positivo - difuso em mais de dois terços do epitélio	17 (63,0)

Fonte: elaborado pela autora (2023)

Nenhuma associação com significância estatística entre o marcador Ki-67 e HPV 16 [$\chi^2_{(2)} 3,258$; $p = 0,24$], assim como não foi observada associação significativa envolvendo o marcador p16 [$\chi^2_{(2)} 2,521$; $p = 0,31$] (Tabela 4). Não foi possível executar esta análise para examinar associação com HPV 18, pois apresentou-se negativo em todas as 25 amostras analisadas.

Tabela 4 — Relação entre os marcadores Ki-67, p16 e HPV* 16

Marcador e partes do tecido epitelial	HPV 16	
	Negativo	Positivo
Ki-67		
Núcleos no terço inferior do epitélio (10-30%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)
Núcleos em dois terços inferiores do epitélio (30-70%)	3 (37,5%)	5 (62,5%)
Núcleos em mais de dois terços do epitélio (70%)	2 (25,0%)	6 (75,0%)
p16		
Negativo	2 (100,0%)	0 (0,0%)
Positivo – difuso nos dois terços inferiores do epitélio	2 (33,3%)	4 (66,7%)
Positivo – difuso em mais de dois terços do epitélio	6 (40,0%)	9 (60,0%)

*HPV = *Human papillomavirus*

Fonte: elaborado pela autora (2023)

Quanto ao método utilizado para detectar lesões (biópsia e CAF) não foram identificadas associações estatisticamente significativas com o marcador Ki-67 [$\chi^2_{(3)} 0,987$; $p = 1,00$], tampouco foram observadas associações significativas relacionadas ao marcador [$\chi^2_{(3)} 2,292$; $p = 0,54$] (Tabela 5).

Tabela 5 — Relação entre os marcadores Ki-67 e p16 e procedimento adotado para detecção de lesões

Marcador e partes do tecido epitelial	Procedimento	
	Biópsia	CAF*
Ki-67		
Núcleos da camada basal (<10%)	0 (0,0%)	1 (100,0%)
Núcleos no terço inferior do epitélio (10-30%)	3 (37,5%)	5 (62,5%)
Núcleos em dois terços inferiores do epitélio (30-70%)	4 (44,4%)	5 (55,6%)
Núcleos em mais de dois terços do epitélio (70%)	3 (33,3%)	6 (66,7%)
p16		
Negativo	0 (0,0%)	2 (100,0%)
Positivo – difuso no terço inferior do epitélio	0 (0,0%)	2 (100,0%)
Positivo – difuso nos dois terços inferiores do epitélio	3 (50,0%)	3 (50,0%)
Positivo – difuso em mais de dois terços do epitélio	7 (41,2%)	10 (58,8%)

*CAF – Cirurgia de alta frequência.

Fonte: elaborado pela autora (2023)

Quanto à ploidia do DNA, os resultados não mostraram diferenças significativas entre o marcador Ki-67 [$\chi^2_{(3)} 2,505$; $p = 0,56$], assim como não indicaram diferenças significativas entre o marcador p16 [$\chi^2_{(3)} 3,639$; $p = 0,33$] (Tabela 6).

Tabela 6 — Relação entre os marcadores Ki-67 e p 16 e resultados da ploidia do DNA

Marcador e partes do tecido epitelial	Ploidia	
	Euploidia	Aneuploidia
Ki-67		
Núcleos da camada basal (<10%)	1 (100,0%)	0 (0,0%)
Núcleos no terço inferior do epitélio (10-30%)	2 (25,0%)	6 (75,0%)
Núcleos em dois terços inferiores do epitélio (30-70%)	4 (50,0%)	4 (50,0%)
Núcleos em mais de dois terços do epitélio (70%)	4 (44,4%)	5 (55,6%)
p16		
Negativo	0 (0,0%)	2 (100,0%)
Positivo – difuso no terço inferior do epitélio	2 (100,0%)	0 (0,0%)
Positivo – difuso nos dois terços inferiores do epitélio	2 (33,3%)	4 (66,7%)
Positivo – difuso em mais de dois terços do epitélio	7 (43,8%)	9 (56,3%)

Fonte: elaborado pela autora (2023)

Foi avaliado em que medida o somatório dos escores obtidos dos marcadores Ki-67 e p16 diferenciavam entre os resultados do tratamento envolvendo a CAF. Os resultados não revelaram diferença com significância estatística entre as variáveis categorias da CAF [$\chi^2(12) 10,495$; $p = 0,97$] (Tabela 7).

Tabela 7 — Relação entre o somatório dos escores Ki-67 e p16 e os resultados do tratamento por meio da CAF*

Somatório dos escores Ki-67 e p 16	Resultado da CAF*			
	Sem lesão	NIC** II	**NIC III	Carcinoma escamocelular invasor
1	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
3	0 (0,0%)	1 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
4	1 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
5	0 (0,0%)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0 (0,0%)
6	0 (0,0%)	2 (50,0%)	1 (25,0%)	1 (25,0%)

*CAF = Cirurgia de alta frequência; **NIC = Neoplasia Intraepitelial Cervical

Fonte: elaborado pela autora (2023)

1.5. DISCUSSÃO

Identificar qual paciente apresenta uma lesão com potencial oncogênico de progressão e com necessidade de tratamento é um desafio em lesões tipo NIC 2 do colo uterino já definido na literatura médica. O presente estudo também ratifica essa preocupação. Das pacientes que apresentaram diagnóstico de NIC 2 e que foram submetidas à tratamento excisional nesse estudo, somente 27,6% apresentaram o mesmo diagnóstico confirmatório. A mesma porcentagem de 27,6% apresentou lesão mais grave (20,7% NIC 3 e 6,9% CEC). No outro extremo, 6,9% não apresentaram lesão residual (Figura 3). Isso sugere a necessidade de melhorar as formas de identificar qual destas pacientes realmente progredirão para a neoplasia.

Discute-se na literatura qual seria o melhor método de rastreio para selecionar a paciente certa para tratamento e assim evitar iatrogenia, já que a maioria das

pacientes estão na idade reprodutiva e um tratamento excisional poderia influenciar em seu futuro obstétrico.

O uso de teste de HPV vem sendo citado em diversas publicações como uma boa estratégia de rastreio. *Guidelines* estão sendo reestruturados tendo o seu uso como estratégia principal, substituindo a tradicional citologia oncológica. A *American Cancer Society* (ACS) recomenda que rastreamento se inicie com o teste de HPV (SASLOW; SOLOMON, 2012). A Sociedade Europeia de Oncologia Ginecológica (ESGO), a Federação Europeia de Colposcopia (EFC) e o *Australian Institute of Health and Welfare* apoiam o auto-teste de HPV como forma de rastreamento (KYRGIU et al., 2020). A *US Preventive Services Task Force* recomenda que entre 21 à 29 anos seja realizado o teste citológico e, para acima dos 30 anos, associa o uso do teste de HPV como método de rastreio (CURRY et al., 2018).

O Brasil ainda não estabeleceu mudança no rastreamento e mantém a citologia oncológica, mas um grupo de pesquisadores já têm proposta estabelecida e publicada de mudança no rastreamento com base na possibilidade do uso do HPV-DNA e genotipagem. Na proposta citada, o uso do teste de HPV seria realizado para mulheres acima de 25 anos. (CLARO; DE LIMA; DE ALMEIDA, 2021; ZEFERINO et al., 2018) No entanto, a própria OMS ressalta que não é aconselhável testar estes vírus em mulheres com menos de 30 anos de idade porque muitas mulheres jovens estão infectadas com eles, pois a maioria das infecções por HPV serão eliminadas espontaneamente dos seus corpos antes de atingirem a idade de 30 anos. Assim o teste de HPV poderá detectar muitas mulheres com infecções transitórias por HPV e poderá submetê-las a procedimentos e tratamentos desnecessários que podem causar danos, ansiedade, desconforto e despesas (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021).

Para responder a este questionamento, nesse estudo, os pesquisadores brasileiros do estudo propõem incorporar a citologia como um teste de triagem (após um teste de HPV positivo e antes do encaminhamento à colposcopia). Nesse contexto, o uso de imunomarcadores p16 e ki-67 poderia ser uma opção válida também nesses casos, embora não ter sido explorado nessa proposta (ZEFERINO et al., 2018).

Nas diretrizes de 2012 do Projeto “*Lower Anogenital Squamous Terminology*” para Lesões Associadas ao HPV (LAST) há a recomendação da coloração p16 para lesões NIC 2 em que o patologista está em dúvida. A positividade para p16 de pelo

menos um terço do epitélio apoia o diagnóstico de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG), e o tratamento de todos os LIEAG é recomendado. No entanto, o marcador p16 isolado também possui validade discutida por conta de possíveis casos falso positivos e negativos (DARRAGH et al., 2012).

Mais de metade das lesões NIC 2 e um número substancial de lesões NIC 3 irão regredir. Assim, o tratamento de todas as HSIL resulta num tratamento excessivo considerável que tem consequências importantes, especialmente para as mulheres em idade fértil, em termos de morbidade cervical e parto prematuro (VAN ZUMMEREN et al., 2018).

Vem crescendo os estudos envolvendo os imunomarcadores para avaliar lesões escamosas intraepiteliais. Ghosh e colaboradores, em 2020, encontrou nas amostras de lesão escamosa intraepitelial 100% de expressão de Ki-67 com uma expressão comparativamente boa de p16 em HSIL seguido de LSIL. Os autores sugerem que em casos com p16 positivo e com alta expressão de Ki-67 devem ser avaliados posteriormente para tipagem de DNA de HPV (GHOSH et al., 2020).

Zhang and Shen afirmam em seu estudo que a positividade para p16INK4a e Ki-67 estão correlacionadas com a progressão de LSIL/CIN1. E que esses marcadores podem ser preditores independentes da progressão de LSIL/CIN1 (SHEN et al., 2022).

Em 2022, um grupo chinês, tentou explorar o valor da coloração dupla p16 / ki-67 combinada com testes citologia em meio líquido e teste de HPV (detecção tripla) na melhoria da especificidade diagnóstica de NIC2 e na redução do diagnóstico perdido de lesões NIC 2. Concluíram que a detecção tripla pode distinguir quase todas as lesões cervicais NIC 2 (YU et al., 2022).

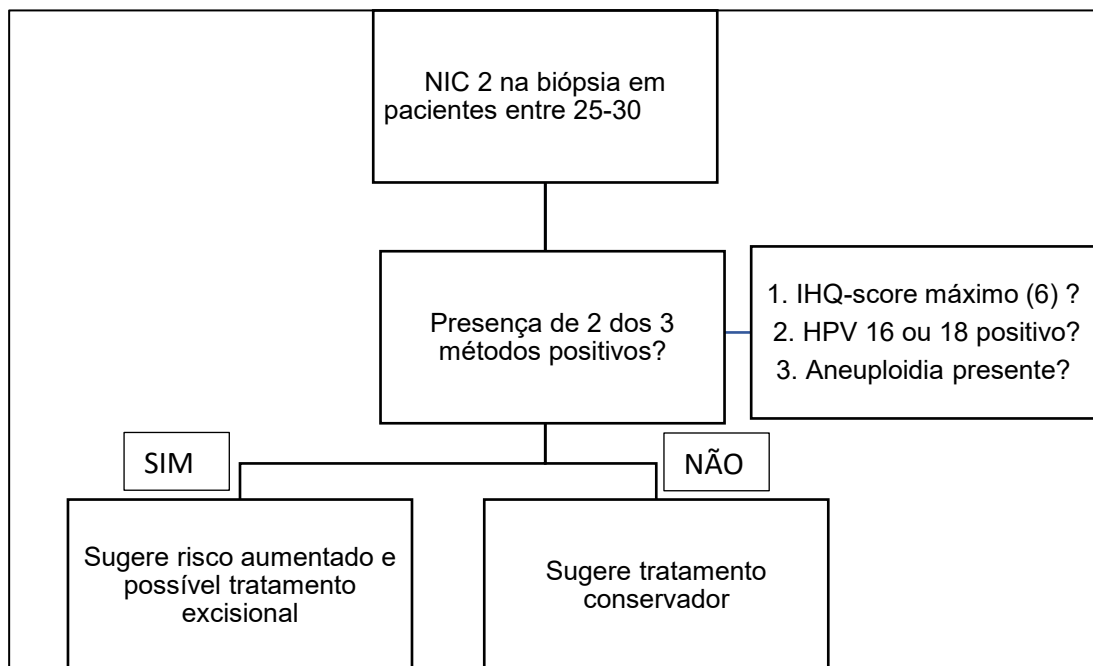
Um grupo de pesquisadores criou uma proposta de imunoescor de Ki-67 e p16-ink4a que poderia beneficiar as pacientes na redução da prática atual de tratamento excessivo. No entanto, a avaliação de Ki-67 e p16-ink4a tem algumas limitações, que o próprio autor cita no estudo. Ainda envolve a avaliação microscópica de uma biópsia com o respectivo erro de amostragem, e a interpretação da imunocoloração pode ser difícil em alguns casos. A proposta de imunoescor poderia reduzir a níveis muito baixos esses problemas (VAN ZUMMEREN et al., 2018).

No presente estudo, quando avaliada a faixa etária entre 25 a 30 anos, naquelas pacientes em que o score se caracterizou como máximo (IHQ score = 6)

pode-se observar que todas as pacientes apresentaram na histopatologia da CAF (padrão ouro) lesão de alto grau (2 NIC 2; 1 NIC 3; 1 CEC). Quando observado o outro extremo, em que o imunoescore foi mais baixo ($0 \leq \text{IHQ-score} \leq 4$) foram encontradas na histopatologia da CAF a presença de pacientes com lesão de alto grau e ausência de lesão residual (2 NIC 2; 2 sem lesão residual; 1 CEC). Com essa análise podemos inferir que o método isolado de imunoescore não parece ser uma variável confiável para definir isoladamente uma conduta.

Uma proposta para desenvolvimento futuro desse estudo, seria o uso de um somatório de dois métodos associados (Duplo método positivo), em que poderia melhorar a sensibilidade e especificidade dos métodos. Nessa proposta, justificaria o tratamento excisional para a paciente citada anteriormente (IHQ score baixo, porém CEC na CAF) visto que esta também apresentava aneuploidia e a presença de HPV 16 na genotipagem. Portanto, na análise do estudo, se tivesse sido aplicado o “Duplo método positivo”, 3 pacientes poderiam ter sido somente acompanhadas, em vez de ter realizado tratamento excisional. A proposta para futuro fluxograma de manejo pode ser vista na Figura 6.

Figura 6 — Proposta de Fluxograma para auxiliar na decisão clínica quanto a tratamento excisional ou conservador



Elaborado pela autora (2023)

1.6. CONCLUSÃO

Nesse estudo não se observaram diferenças significativas quanto a comparação dos marcadores imuno-histoquímicos p16 e ki-67 com os métodos analisados (CAF, Genotipagem de HPV e citometria de DNA), quando analisamos pacientes com lesões tipo NIC 2 na histopatologia da biópsia. Contudo, observou-se que nesse grupo estudado, a análise de p16 e ki-67 pode auxiliar na decisão terapêutica nas pacientes entre 25 à 30 anos quando se trata de lesões intermediárias (NIC 2) e evitar iatrogenia. A padronização da análise dos marcadores através de um score imuno-histoquímico (IHQ-score) pareceu auxiliar a diminuir erros de análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIBBO, M. et al. **Ploidy patterns in cervical dysplasia**. American Journal of Clinical Pathology., v. 7, n. 3, p. 213–7, set. 1985.
- BÖCKING, A.; HUY NGUYEN, V. Q. **Diagnostic and Prognostic use of DNA Image Cytometry in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Invasive Carcinoma**. Cancer Cytopathology, v. 102, n. 1, p. 41–54, fev. 2004.
- BOLLMANN, R. et al. **DNA cytometry confirms the utility of the Bethesda System for the classification of Papanicolaou smears**. Cancer v. 93, n. 3, p. 222–228, jun. 2001.
- BURD, E. **Human papillomavirus and cervical cancer**. Clinical Microbiology Reviews, v. 16, n. 1, p. 1–17, jan. 2003.
- CASTELLSAGUÉ, X. **Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer**. Gynecologic Oncology, v. 110, n. 3 SUPPL.2, p. 4–7, set 2008.
- CLARO, I. B.; DE LIMA, L. D.; DE ALMEIDA, P. F. **Cervical cancer guidelines, prevention and screening strategies: Experiences from Brazil and Chile**. Ciência e Saúde Coletiva, v. 26, n. 10, p. 4497–4509, maio. 2021.
- COSTA, A. F. et al. **DNA ploidy measurement and human papillomavirus in abnormal cervical cytology**. Cytopathology, v. 32, n. 2, p. 180–186, 30 mar. 2021.
- CURRY, S. J. et al. **Screening for Cervical Cancer**. JAMA, v. 320, n. 7, p. 674, 21 ago. 2018.
- DANIELSEN, H. E.; PRADHAN, M.; NOVELLI, M. **Revisiting tumour aneuploidy — the place of ploidy assessment in the molecular era**. Nature Reviews Clinical Oncology, v. 13, n. 5, p. 291–304, 24 maio 2016.
- DARRAGH, T. M. et al. **The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology**. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, v. 136, n. 10, p. 1266–1297, 1 out. 2012.
- GHOSH, A. et al. **Assessment of p16 and ki67 immunohistochemistry expression in squamous intraepithelial lesion with cytohistomorphological correlation**. Iranian Journal of Pathology, v. 15, n. 4, p. 268–273, jul. 2020.
- GIAM, M.; RANCATI, G. **Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos**. Cell Division, v. 10, n. 1, p. 3, dez. 2015.

HAROSKE, G. et al. **Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry.** Analytical cellular pathology: the Journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology, v. 23, n. 2, p. 89–95, jan. 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2022.

KOTAKE, Y. et al. **Transcriptional regulation of the p16 tumor suppressor gene.** Anticancer Research, v. 35, n. 8, p. 4397–4402, ago. 2015.

KYRGIUO, M. et al. **Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis.** The Lancet, v. 367, n. 9509, p. 489–498, fev. 2006.

KYRGIUO, M. et al. **Cervical screening: ESGO-EFC position paper of the European Society of Gynaecologic Oncology (ESGO) and the European Federation of Colposcopy (EFC).** British Journal of Cancer Springer Nature, ago. 2020.

LUFF, R. D. et al. **The revised Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: Report of the 1991 Bethesda workshop.** Acta Cytologica, v. 36, p. 273–276, mai-jun. 1992.

MANIAR, K. P. et al. **Role of the Biomarker p16 in Downgrading -IN 2 Diagnoses and Predicting Higher-grade Lesions.** American Journal of Surgical Pathology, v. 39, n. 12, p. 1708–1718, dez. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes Brasileiras para Rastreamento do Câncer do Colo do Útero.** Rio de Janeiro, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais.** Rio de Janeiro, 2012.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. **Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation.** Nature Reviews Cancer, v. 10, n. 8, p. 550–560, jul. 2010.

NASIELL, K.; NÄSLUND, I.; AUER, G. **Cytomorphologic and cytochemical analysis in the differential diagnosis of cervical epithelial lesions.** Analytical and Quantitative Cytology, v. 6, n. 3, p. 196–200, set. 1984.

NAYAR, R.; WILBUR, D. C. **The pap test and Bethesda 2014: “The reports of my demise have been greatly exaggerated.” (After a quotation from Mark Twain).** Acta Cytologica, v. 59, n. 2, p. 121–132, maio 2015.

PARKIN D et al. **Cancer Incidence in Five Continents Volume VIII**. IARC Scientific Publications. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/>>.

POGERE, Adriana. **Análise multimodal da citologia, colposcopia, teste do HPV e DNA-ICM no prognóstico da neoplasia intraepitelial cervical**. Tese (doutorado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.

REAGAN, J. W.; HICKS, D. J. **A study of in situ and squamous-cell cancer of the uterine cervix**. *Cancer*, v. 6, n. 6, p. 1200–1214, nov. 1953.

RICHARD, R. **Natural history of cervical intraepithelial neoplasia**. *Clinical Obstetric Gynecology*, v. 10, n. 4, p. 748–84, 1967.

SASLOW, D.; SOLOMON, D. **American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines**. *Journal for Clinicians*, v. 62, n. 3, p. 147–172, jul. 2012.

SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes**. Disponível em: <<https://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=4&chap=2>>. Acesso em: 15 out. 2020.

SELLORS JW, S. R. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes**. SBN-13 (Database), 2003.

SHEN, W. et al. **Therapeutic effect and safety of curcumin in women with PCOS: A systematic review and meta-analysis**. *Frontiers in Endocrinology*, v. 13, n. October, p. 1–16, out. 2022.

SOLOMON, D. **The 1988 Bethesda System for Reporting Cervical /Vaginal Cytologic Diagnoses**. *Diagnostic Cytopathology*, v. 5, n. 3, p. 331–334, 1989.

SOLOMON, D. et al. **The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology**. *Journal of American Medical Association*, v. 287, n. 16, p. 2114–19, abril 2002.

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

TORRES-IBARRA, L. et al. **Adjunctive testing by cytology, p16/Ki-67 dual-stained cytology or HPV16/18 E6 oncoprotein for the management of HPV16/18 screen-positive women**. *International Journal of Cancer*, p. 1–10, out. 2020.

VAN ZUMMEREN, M. et al. **Three-tiered score for Ki-67 and p16 ink4a improves accuracy and reproducibility of grading CIN lesions**. *Journal of Clinical Pathology*, v. 71, n. 11, p. 981–988, nov. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention.** United Kingdom, 2021.

WONG, O. G. et al. **An automated quantitative DNA image cytometry system detects abnormal cells in cervical cytology with high sensitivity.** *Cytopathology*, v. 29, n. 3, p. 267–274, jun. 2018.

YU, L. et al. **Significance of Triple Detection of p16/ki-67 Dual-Staining, Liquid-Based Cytology and HR HPV Testing in Screening of Cervical Cancer: A Retrospective Study.** *Frontiers in Oncology*, v. 12, jun. 2022.

ZEFERINO, L. C. et al. **Guidelines for HPV-DNA testing for cervical cancer screening in Brazil.** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria*. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetria, jun. 2018.

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

ANEXOS

APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM HUMANOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise Multimodal das Atípias do Colo Uterino

Pesquisador: Alexandre Sherley Casimiro Onofre

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57423816.3.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.326.458

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda de um estudo Programa de pós-graduação em Ciências Médicas e Programa de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina orientado pelo professor dr. Alexandre Sherley Casimiro Onofre. Estudo prospectivo transversal, envolvendo mulheres que serão atendidas no ambulatório de ginecologia e colposcopia do Hospital Universitário da UFSC, que apresentarem alterações citológicas na colpocitologia oncótica. Os pesquisadores apresentaram como justificativa para a realização da emenda os seguintes aspectos: "Registrar que o teste de HPV previsto na metodologia o projetos será

realizado pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). A declaração do diretor do referido Laboratório autorizando sua execução foi anexadas; Incluir a aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmácia Carolina Marian Pedrini(CPF: 060.245.859-50); Como algumas das metodologias do projeto não foram possíveis de serem executadas em tempo hábil por dificuldades relacionadas ao atraso de quase

um ano para a coleta das amostras das pacientes e obtenção dos reagentes para as metodologias previstas, alteração de cronograma ampliando o prazo de coleta de demais etapas." Os pesquisadores esclarecem que não houve alteração do projeto original em nenhuma das etapas, permanecendo, os mesmos objetivos e metodologias anteriormente propostas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.326.458

Realizar uma análise multimodal das atipias do colo uterino utilizando métodos tais como a citometria do DNA (DNA-ICM), imunocitoquímica, teste de HPV, AgNOR e hibridização in situ por fluorescência (FISH).

Objetivo Secundário:

. Avaliar a ploidia do DNA nas células atípicas; . Analisar a positividade dos anticorpos anti-Ki67, anti-p53 e anti p16ink4a; . Analisar a associação entre os graus de atipias identificados nas células cervicais e a presença do HPV detectada por PCR e captura híbrida e sua genotipagem; . Identificar os subtipos de HPV de alto risco mais prevalentes no nosso meio; . Analisar a hiperexpressão das regiões nucleolares por prata (AgNOR) nas células atípicas; . Identificar alterações cromossômicas em células atípicas por hibridização in situ por fluorescência. Fazer uma análise comparativa multimodal em prever o risco de gravidade das lesões; . Identificar os sinais/achados colposcópicos mais importantes numa análise conjunta com a ploidia do DNA em prever o risco de gravidade das lesões

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são mínimos decorrentes da coleta cérvico-vaginal, já realizada e indicada rotineiramente.

Benefícios:

As pacientes que apresentarem resultados positivos nos métodos adjuvantes serão convidadas a visita médica para acompanhamento adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores realizaram a justificativa da emenda e anexaram a documentação informada relativo a inclusão do novo laboratório e de novo pesquisador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE sem alteração relacionada a primeira versão.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclusão: aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.326.458

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1339024_E1.pdf	22/04/2019 11:00:35		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao.pdf	22/04/2019 10:59:01	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Outros	Emenda.pdf	22/04/2019 10:58:09	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoGuardaChuva2016.pdf	28/06/2016 15:00:45	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDiretor.pdf	28/06/2016 15:00:27	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/06/2016 14:58:51	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	28/06/2016 14:54:13	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 15 de Maio de 2019

Assinado por:
Nelson Canzian da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br