



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE IMPERATRIZ
CAMPUS II – IMPERATRIZ/MA
CURSO DE MEDICINA

SARA BRANDÃO DOS SANTOS

O IMPACTO DA AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA P16INK4A E KI-67NA PROGRESSÃO DO GRAU DE LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL UTERINA

SARA BRANDÃO DOS SANTOS

**O IMPACTO DA AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA
P16INK4A E KI-67NA PROGRESSÃO DO GRAU DE LESÃO
INTRAEPITELIAL CERVICAL UTERINA**

Trabalho de Conclusão de Ciclo apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão - UFMA/Imperatriz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Graziany
Camelo de Carvalho

Co-orientadora: Ma. Eveline Brandão
Madeira

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Santos, Sara Brandão dos.

O impacto da avaliação imuno-histoquímica para p16ink4a e ki-67 na progressão do grau de lesão intraepitelial cervical uterina / Sara Brandão dos Santos. - 2023.

35 f.

Coorientador(a): Eveline Brandão Madeira.

Orientador(a): Guilherme Graziany Camelo de Carvalho.

Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2023.

1. Imuno-histoquímica. 2. Ki-67. 3. NIC. 4. P16. I. Carvalho, Guilherme Graziany Camelo de. II. Madeira, Eveline Brandão. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE IMPERATRIZ
CURSO DE MEDICINA

Candidato: Sara Brandão dos Santos

Título do TCC: O impacto da avaliação imuno-histoquímica para p16ink4a e ki-67 na progressão do grau de lesão intraepitelial cervical uterina

Orientador: Guilherme Graziany Camelo de Carvalho
Universidade Federal do Maranhão - Curso de Medicina/CCIm

Co-orientador: Eveline Brandão Madeira
Universidade Federal do Maranhão - Curso de Medicina/CCIm

A Banca Julgadora de trabalho de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, em sessão pública realizada a 04/04/2023, considerou:

Aprovado **Reprovado**

Banca Examinadora:

Guilherme Graziany Camelo de Carvalho – Orientador e mediador da banca
Jullys Allan Guimaraes Gama – Membro da banca
Fernando Barbosa Brandão – Membro da banca

Imperatriz (MA), de 04 abril de 2023.

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO

Título: O Impacto Da Avaliação Imuno-Histoquímica Para P16ink4a E Ki-67 Na Progressão Do Grau De Lesão Intraepitelial Cervical Uterina

Autores: Sara Brandão dos Santos, Guilherme Graziany Camelo de Carvalho, Eveline Brandão Madeira

Status: Submetido

Periódico: Revista Brasileira De Ginecologia E Obstetrícia

ISSN: 0100-7203

Fator de impacto: B1

DOI: 10.1055/s-00030576

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 METODOLOGIA	10
3 RESULTADOS.....	13
4 DISCUSSÃO.....	18
5 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23
ANEXO.....	26
ANEXO A Termo de Autorização	26
ANEXO B Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa – CEP-HUUFMA	27
APÊNDICE.....	35
APÊNDICE A Declaração do Fiel Depositário.....	35
APÊNDICE B Termo de Compromisso de Utilização de Dados.....	36
APÊNDICE C Solicitação de Dispensa de TCLE.....	37

THE IMPACT OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION FOR P16INK4A AND KI-67 ON THE PROGRESSION OF THE DEGREE OF UTERINE CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESION

Sara Brandão dos Santos¹

Guilherme Graziany Camelo de Carvalho²

Eveline Brandão Madeira³

¹0009-0003-0854-5881

Rua Sousa lima 239, Imperatriz, MA, 65900-320

Sarabr86@gmail.com

Aluna de Medicina da Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, MA, Brasil.

²Professor do curso de Medicina na Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, MA, Brasil.

³Mestre em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, PI, Brasil.

DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Declaramos que não há conflito de interesse.

FONTE DE FINANCIAMENTO

Não houve.

Resumo

Objetivo: Analisar o vínculo entre o grau de progressão histológico das neoplasias intraepiteliais cervicais uterinas e a expressão imuno-histoquímica para p16 e do ki-67.

Metódos: Trata-se de um estudo analítico, transversal, observacional e de abordagem quantitativa feita através de uma análise de laudos e sistema próprio do local de pesquisa, de pacientes diagnosticadas com Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) no Laboratório Histopath. A partir dessa análise, foram separadas aquelas sem NIC daquelas com NIC de acordo com a expressão dos marcadores. Após essa seleção, as pacientes sem lesão foram utilizadas como controle, enquanto a expressão dos biomarcadores p16 e ki-67 naquelas que tiveram algum tipo de neoplasia intraepitelial cervical foram graduados pela intensidade. **Resultados:** Nesse âmbito, em concordância com a literatura, a maior parte das lâminas (61,9%) não expressou marcação para a proteína. Também se observou que imunorreatividade do Ki-67 foi vista em todas as amostras, pois se relaciona evidência de proliferação celular, de forma que este marcador é expresso em todas as fases do ciclo celular. Por conseguinte, o padrão de marcação para p16 e de ki- 67 tem significativa correlação com o grau da lesão, assim, observa-se concordância com os demais estudos. **Conclusão:** Portanto, ao final das análises foi verificado que 80,95% de pacientes tinham a lesão de câncer de colo de útero, sendo que 38,09% estavam com expressão de p16 e 100% estavam com a expressão de ki-67, sendo que a superexpressão dos marcadores obteve correlação positiva com o grau da lesão.

Palavras-chave: NIC; p16; Ki-67; imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero não possui geralmente uma progressão rápida, permitindo o rastreamento, diagnóstico e tratamento de suas lesões precursoras. Outra peça fundamental no seguimento e o tratamento é a reprodutibilidade diagnóstica dos exames citopatológicos e histopatológicos ⁽³⁾. Na classificação de tumor cervical uterino, as lesões precursoras do câncer de colo uterino são classificadas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) I, II e III ⁽⁴⁾. Essas são comumente associadas à infecção pelo Papiloma Vírus Humana (HPV) ^(5,6).

Anteriormente ao diagnóstico existe uma fase pré-clínica (sem sintomas) em que a detecção de lesões precursoras pode ser feita por meio do principal método de rastreio o exame preventivo, Papanicolau. Especificamente, é feita a inspeção do colo do útero e da região interior da vagina, além da coleta de células da endocérvice e da ectocérvice para que seja feita uma análise citopatológica. Os resultados podem variar de infecção pelo HPV ou lesão de baixo grau, alto grau ou negativo para câncer e amostra insatisfatória ^(1,2).

A definição de lesões é atribuída nas neoplasias intraepiteliais cervicais podendo ser de alto grau ou não ⁽⁷⁾. Atualmente a menor taxa de concordância diagnóstica referente ao diagnóstico de lesões NIC II, são classificadas de maneira errônea, seja por subdiagnóstico ou por sobrediagnóstico. Tal fato também ocorre por que as lesões NIC grau II são identificadas como uma mistura de lesões transitórias e lesões verdadeiramente pré-cancerígenas ^(8,9).

Nesse contexto, dados científicos sugerem o uso de biomarcadores, como o p16 e o Ki-67, para auxílio no diagnóstico histopatológico e nos prognósticos das lesões intraepiteliais do colo uterino, pois somente o uso do marcador p16 tem apresentado limitações do seu uso de rotina em todos os casos. Além disso, evidências apontam que o Ki-67 também pode auxiliar na definição diagnóstica, no entanto não há determinantes suficientes para indicar em que situações estaria melhor indicada sua utilização ⁽³⁾.

A p16 é uma proteína supressora tumoral responsável pelo bloqueio da atividade das quinases ciclo-dependentes CDK4/6. Com a inativação dessa proteína ocorrem mudanças no ciclo celular que resultam no seu acúmulo no núcleo e citoplasma das células afetadas pelo HPV e, conseqüentemente, permitindo a sua identificação na imuno-histoquímica ^(10,11).

Com isso, essa proteína é usada como um biomarcador, adicionando uma significativa precisão diagnóstica na avaliação de lesões cervicais, principalmente, em lesões de alto grau e avaliar a probabilidade de progressão em lesões consideradas ainda de baixo risco. Nesse contexto, a porcentagem de expressão é proporcional ao grau de lesão cervical ^(5,9).

O Ki-67 é um marcador de proteína não-histônica de proliferação celular, tem a função de se expressar em crescimento de tumores humanos sugerindo o grau de malignidade ⁽¹²⁾. Nessa perspectiva, a positividade do Ki-67 demonstra uma crescente proliferação de lesões intraepiteliais de baixo e alto grau. Assim, há fortes evidências de que a p16 e Ki-67 tem correlação no reconhecimento do HPV associada às lesões cervicais pré-neoplásicas. ⁽¹³⁾.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo é correlacionar o grau de progressão histológico das neoplasias intraepiteliais cervicais uterinas e a expressão imuno-histoquímica para p16 e do ki-67. Como também, estratificar por idade a população acometida; avaliar a correlação entre os possíveis indicadores; analisar grau de malignidade NIC com a presença dos marcadores p16 e k- 67; averiguar a expressão imuno-histoquímica da p16 e do ki-67 em pacientes com pesquisa de HPV de alto grau positiva pela técnica de PCR.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo analítico, transversal e observacional de abordagem quantitativa. A pesquisa foi elaborada no Laboratório Histopath – Patologia e Citopatologia Diagnóstica, localizado na Rua Maranhão, nº 302 – Centro, CEP: 65901-590, na cidade de Imperatriz, no estado do Maranhão, durante os anos de 2020 e 2021.

Para o estudo, foram analisados laudos de biópsia de colo do útero de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical. Os mesmos foram submetidos ao exame imunohistoquímico para o tipo da neoplasia no Laboratório HISTOPATH de Imperatriz-MA, nos períodos entre novembro de 2020 e maio de 2021, com 42 pacientes registrados em sistema próprio do local de pesquisa.

Inicialmente, as biópsias foram fixadas em formol, incluídas em parafina e recortadas na medida de quatro micrômetros e posteriormente ocorreu a desparafinização das lâminas em xileno, em seguida foram reidratadas. Assim, para a recuperação dos antígenos, as lâminas foram aquecidas em tampão citrato pH 6,0 no micro-ondas por 20 min. As secções foram colocadas à temperatura ambiente e lavadas com tampão fosfato três vezes durante 5 min cada. Após o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram reidratados e as lâminas submetidas ao processo imuno-histoquímico. A técnica de imuno-histoquímica é um método muito sensível e específico, reconhecendo a localização dos antígenos em amostras histológicas, usando anticorpos.

Para determinar a expressão do p16INK4a foi usado anticorpo monoclonal de camundongo (clone JC6, diluído 1:100, Bio Care Medical, Erviegas), sendo incubado por 40 minutos na temperatura de 38°C. Já para determinar a expressão do ki-67 foi usado um anticorpo monoclonal de coelho (clone SP6, diluído 1:200, Bio Care Medical, Erviegas), sendo incubado por 16 minutos na temperatura de 37°C. O mecanismo de detecção realizado na pesquisa para ambos os antígenos em tecidos foi avidina-biotina peroxidase. As lâminas, então, foram contracoradas com hematoxilina de Mayer, diferenciados com reagente azulado ($\text{Li}_2\text{CO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$).

Para detecção de p16INK4a, como controles negativos, foram utilizadas lâminas sem neoplasia intraepitelial cervical e, como controles positivos, lâminas com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC III). Quanto à interpretação dos marcadores, o teste foi considerado positivo quando houve expressão nuclear do biomarcador p16 e negativo quando a expressão não foi detectada microscopicamente. Ademais, na interpretação do marcador ki-67 todas as amostras apresentaram o marcador, no entanto, com graus de expressão

diferenciados. A expressão imuno-histoquímica, quando positiva, foi dividida percentualmente em menos de 10%, entre 10% e 50% ou maior que 50%, em relação à porcentagem de células. As lâminas foram submetidas a uma análise cega por patologista com experiência clínica.

Os laudos utilizados foram selecionados mediante contemplação dos critérios de inclusão e exclusão da pesquisa. Desse modo, dos laudos imunohistoquímicos e do sistema próprio do laboratório foram extraídas as informações referentes à classificação histológica do tumor e sua graduação histológica, levando em consideração a classificação de Bethesda 1988.

Concomitantemente, dos laudos dos exames imunohistoquímicos foram obtidos os dados acerca da presença dos biomarcadores ki-67 e p16 possibilitando a classificação molecular do tumor. Ademais, os casos com diagnóstico de NIC foram separados daqueles sem NIC. Assim, o grupo controle (CTRL) foi formado por pacientes sem neoplasia intraepitelial cervical e as expressões dos biomarcadores p16 e ki-67 naquelas com lesão intraepitelial cervical foi graduada pela sua intensidade.

Todas as informações coletadas foram organizadas, tabuladas e armazenadas em um banco de dados específico no Microsoft Excel, versão 2016. Para análise de correlações significativas, foi utilizado o Teste Qui-quadrado de Pearson, com significância estatística de $p < 0,05$ que possibilita o cruzamento de dados e, com isso, foi possível avaliar a relação existente entre os marcadores prognósticos e fatores clinicopatológicos dos participantes da pesquisa. Além disso, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para análise entre média de idade e grupos de classificação de alto grau (AG), baixo grau (BG) e grupo controle.

A população do estudo foi composta pelos pacientes admitidos no Laboratório Histopath. A amostragem do estudo foi estimada com base nos laudos de biópsia de colo do útero de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical, no determinado período de tempo analisado. Com isso, aplicando os critérios de inclusão e exclusão totalizou-se 42 casos aptos para a pesquisa.

Nesse trabalho, foram incluídos dados coletados a partir de laudos e no próprio sistema do laboratório de pacientes admitidos no período de novembro de 2020 a maio de 2021, devido à logística de processamento e armazenamento desses documentos, no laboratório referido.

Foram incluídas no estudo pacientes adultos, do sexo feminino, acima de 18 anos, diagnosticados com neoplasia intraepitelial cervical e que foram acompanhados no laboratório citado, enquadrados no período definido do estudo. Serão excluídos os pacientes que, durante

a análise do laudo e do sistema apresentam idade inferior a 18 anos, pacientes com diagnóstico de carcinoma invasor e pacientes com biópsia apresentando material insuficiente.

Os riscos possíveis de ocorrer são: divulgação de dados confidenciais e risco à segurança dos laudos analisados. Nesse contexto, para minimizá-los, serão aplicadas as normatizações de confidencialidade e de sigilo dos laudos dos pacientes contidas na Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Ademais, os nomes dos pacientes estarão em sigilo, pois a pesquisa será feita a partir do número da biópsia.

Explanando os benefícios, a pesquisa permite, principalmente nos casos em que haja dúvida, uma possibilidade alternativa na terapêutica, para determinar a conduta de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical, com isso uma abordagem mais conservadora pode ser analisada em detrimento a métodos cirúrgicos possivelmente desnecessários. Ademais, essa conduta pode trazer benefícios e é pouco utilizada pelos profissionais especialistas da cidade, contribuindo assim para a ampliação das opções relacionadas ao diagnóstico precoce de uma questão de saúde pública ainda bastante frequente no país.

Inicialmente, a obtenção dos dados foi realizada através da análise de laudos. Foi utilizada a versão 16 do programa Microsoft Excel para a tabulação dos dados.

Posteriormente, os dados foram importados ao programa Excel (Microsoft Office 365®) e para o *software* de acesso aberto R Studio (R Core Team, 2022). A descrição dos resultados categóricos foi feita em frequências brutas (n) e relativas (%) e das variáveis numéricas em mediana e intervalo interquartil (IIQ). Foi realizado teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados, o qual foi rejeitado ($p < 0,001$).

Foi realizado o teste Qui-Quadrado de Pearson para verificação das diferenças entre as variáveis categóricas. A escolha dos testes ocorreu devido à necessidade de determinar se a proporção do desfecho em cada categoria é significativamente diferente. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

Para as variáveis contínuas, como a idade, foi realizado teste de Kruskal- Wallis para verificar a diferença entre as medianas segundo grau histopatológico. A significância estatística também foi estabelecida em $p < 0,05$.

Todos os dados obtidos pertenciam à rede privada de atendimento. Esse trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Plataforma Brasil (CAAE protocolo 53411221.0.0000.5086), sob o parecer de nº 5.181.529, liberado no dia 21/12/2021.

RESULTADOS

No estudo, a amostra foi de 42 pacientes com mediana de idade de 31,0 anos (tabela 1), sendo o grupo de idade de 30 a 39 anos (tabela 2) o mais frequente (42,8%). No grupo controle, com um total de 8 pacientes a média de idade foi de 30,05. No grupo de alto grau, 14 pacientes, com média de 31,05 anos e no de baixo grau com 20 pacientes, teve média de 31,0 anos. Assim, não houve diferença significativa entre as médias de idade e os grupos de classificação das lesões intraepiteliais cervicais, como também entre as médias de idade e a expressão dos dois biomarcadores.

Tabela 1. Mediana de idade segundo grau histopatológico p16 e ki-67.

	N	Mediana	IIQ	Min	Max	P
CTRL	8	30,5	23,7 - 34,0	21	38	0,778
AG	14	31,5	24,7 - 40,5	22	81	
BG	20	31,0	25,7 - 36,2	20	54	
Total	42	31,0	25,0 - 33,02	20	81	

Legenda: Teste de Kruskal-Wallis, para análise entre média de idade e grupos de classificação de alto grau,baixo grau e grupo controle. Fonte: Autoria própria, 2022.

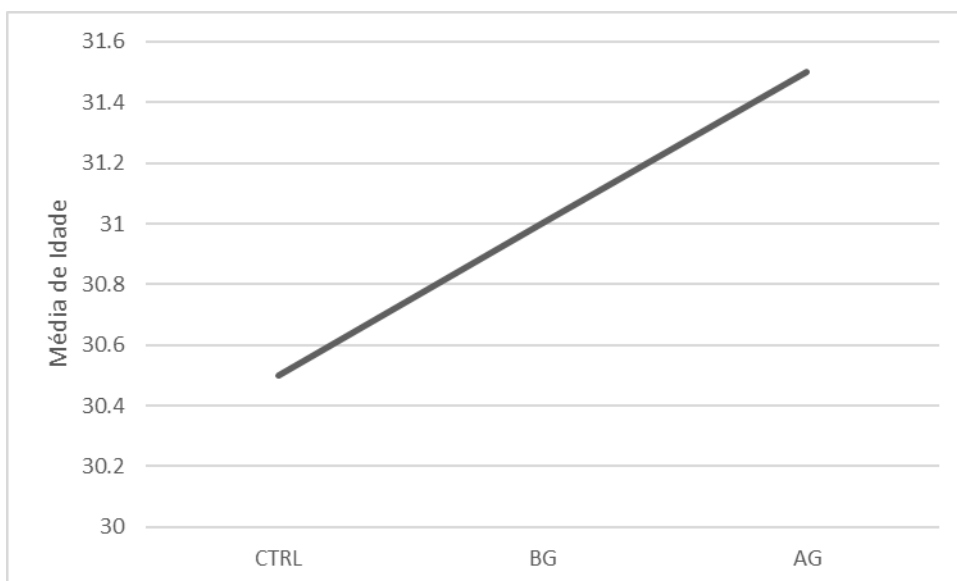
Tabela 2. Grupos de idade.

	Idade	
	N	%
20 a 29 anos	16	38,0
30 a 39 anos	18	42,8
A partir de 40 anos	8	19,04
Total	42	100,0

Fonte: Autoria própria, 2022.

Nesse contexto, a relação entre a média de idade de cada grau de lesão separadamente (gráfico 1) não revelou discrepância significativa, apenas uma crescente da média de idade do grupo controle, baixo grau e alto grau. No entanto, não houve correlação estatística significativa.

Gráfico 1. Média de idade.



Legenda: Médias de idade segundo ordem de disfunção. CTRL = controle, BG = baixo grau e AG = alto grau. Fonte: Autoria própria, 2022.

Ademais, os resultados mais frequentes entre as amostras de p16 e ki-67 (tabela 3) foram: baixo grau (47,6%), seguidos de alto grau (33,3%) e grupo controle (19,0%).

Tabela 3. Grau histológico de p16 e ki-67 das lesões.

	n	%
CTRL	8	19,0
BG	20	47,6
AG	14	33,3
Total	42	100,0

Fonte: Autoria própria, 2022.

Conforme a relação entre a expressão do biomarcador p16 (tabela 4), os resultados mais frequentes foram 0 ou negativo (61,9%), entre dez e cinquenta por cento (14,3%), menor que dez por cento (11,9%) e maior que cinquenta por cento (11,9%).

Tabela 4. Frequência da expressão de p16 em porcentagem.

	n	%
0	26	61,9
< 10	5	11,9
10-50	6	14,3
> 50	5	11,9
Total	42	100,0

Fonte: Autoria própria, 2022.

Em relação à expressão do biomarcador ki-67 (tabela 5), os resultados mais frequentes foram menor que dez por cento (57,1%), entre dez e cinquenta por cento (31,0%) e maior que cinquenta por cento (11,9%).

Tabela 5. Frequência da expressão de ki-67 em porcentagem.

	n	%
< 10	24	57,1
10-50	13	31,0
> 50	5	11,9
Total	42	100,0

Fonte: Autoria própria, 2022.

Assim, no que se refere ao grau de lesão intraepitelial do colo do útero e a expressão imunohistoquímica do biomarcador p16 (tabela 6), houve correlações significativas. Nesse âmbito, quanto maior a porcentagem, maior a classificação da lesão, tendendo para o alto grau. Já no grupo controle, em sua totalidade, obteve a expressão 0 ou negativa. Analisando o grupo de baixo grau apresentou, também, em sua maioria, expressão 0 ou negativa. Quanto ao grupo de alto grau, apenas uma paciente apresentou expressão 0 ou negativa de p16. Nesse âmbito, todas as outras pertencentes a esse grupo expressaram, de forma crescente, em: menor que dez por cento, entre dez e cinquenta por cento e maior que cinquenta por cento (3, 5 e 5, respectivamente).

Tabela 6. Relação entre indicador %p16 e grau histopatológico.

Percentual	AG (N=14)	BG (N=20)	CTRL (N=8)	Total (N=42)	p
%p16					<0,001 (1)
0	1 (7,1%)	17 (85,0%)	8 (100,0%)	26 (61,9%)	
< 10	3 (21,4%)	2 (10,0%)	0 (0,0%)	5 (11,9%)	
10 - 50	5 (35,7%)	1 (5,0%)	0 (0,0%)	6 (14,3%)	
> 50	5 (35,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (11,9%)	

Legenda: Teste Qui-quadrado de Pearson. Fonte: Autoria própria, 2022.

Ademais, quanto ao grau de lesão intraepitelial do colo do útero e a expressão imunohistoquímica do biomarcador ki-67 (tabela 7), observou-se correlações relevantes. Em lesões de alto grau a porcentagem de biomarcadorexpresso tendeu de um nível médio para alto, sendo que em todas as amostras maiores que cinquenta por cento são de alto grau. Concomitantemente, a expressão nas lesões de baixo grau é composta por amostras com percentual de baixo a médiograu. No grupo controle, todas as amostras tiveram baixo grau em relação aomarcador.

Tabela 7. Relação entre indicador %ki-67 e grau histopatológico.

Percentual	AG (N=14)	BG (N=20)	CTRL (N=8)	Total (N=42)	p
%ki-67					<0,001 (1)
< 10	0 (0,0%)	16 (80,0%)	8 (100,0%)	24 (57,1%)	
10 - 50	9 (64,2%)	4 (20,0%)	0 (0,0%)	13 (31,0%)	
> 50	5 (35,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (11,9%)	

Legenda: Teste Qui-quadrado de Pearson. Fonte: Autoria própria, 2022.

Quanto à porcentagem de p16 encontrado nas amostras em relação ao NIC, nota-se que a maioria das lesões com NIC I não possui expressão de p16. Não obstante, os dados mostram uma crescente quando há correlação entre NIC II e a manifestação do biomarcador. Já em NIC III, nenhuma das lesões teve apresentação 0 no p16, sendo somente expressa em outros níveis.

Tabela 8. NIC segundo %p16.

Grau de NIC	0 (N=26)	< 10 (N=5)	10 - 50 (N=6)	> 50 (N=5)	<i>p</i>
CTRL	8 (30,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,072
NIC I	17 (65,4%)	2 (40,0%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	
NIC II	1 (3,8%)	1 (20,0%)	2 (33,3%)	3 (60,0%)	
NIC III	0 (0,0%)	2 (40,0%)	3 (50,0%)	2 (40,0%)	

Fonte: Aatoria própria, 2022.

Outrossim, a correlação entre o grau de ki-67 e NIC, revelou que a maioria das lesões com NIC I têm baixa expressão do biomarcador, enquanto em NIC II e III nenhuma amostra apresentou <10%.

Tabela 9. NIC segundo %ki-67.

Grau de NIC	< 10 (N24)	10 - 50 (N13)	> 50 (N5)	<i>p</i>
CTRL	8 (33,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,005
NIC I	16 (66,7%)	4 (30,8%)	0 (0,0%)	
NIC II	0 (0,0%)	5 (38,5%)	2 (40,0%)	
NIC III	0 (0,0%)	4 (30,8%)	3 (60,0%)	

Fonte: Aatoria própria, 2022.

DISCUSSÃO

O carcinoma de colo uterino está entre as neoplasias malignas com maior perspectiva de prevenção devido às suas alternativas de rastreo e por ser antecedido por um grande período de lesão precursora ^(16,14). No Brasil, o método principal para rastreamento do câncer de colo de útero é o teste de Papanicolau ⁽²⁾.

O biomarcador p16INK4A tem importante função, pois a superexpressão de p16 reflete a persistência da infecção pelo HPV e a transformação maligna das células escamosas, dessa forma, pode ser considerado um biomarcador para a detecção de câncer cervical ⁽¹⁵⁾.

Contudo, quando utilizado o marcador p16 sozinho pode ser necessário à avaliação morfológica para atingir a especificidade adequada das células coradas, o qual é demorado. Isso acontece, pois p16 também é expressa em células cervicais normais, o que torna seu uso limitado no rastreamento ⁽¹⁶⁾. Na tentativa de melhorar a efetividade do rastreo, a expressão conjunta do ki-67 é fundamental, pois é considerado um marcador de proliferação confinado à camada de células parabasais da mucosa escamosa estratificada normal do colo do útero. Assim, a superexpressão do ki-67 em outras camadas do epitélio se correlaciona com a extensão da maturação desordenada, ou seja, indicando que ocorreu desregulação do ciclo celular induzido pelo HPV ou a presença de NIC ⁽¹⁷⁾.

No presente estudo, a média de idade entre as pacientes foi de 33,02 anos, o que corrobora com Da Costa em que a média de idade está em torno de 30 anos ⁽¹⁰⁾. Outro fator que também precisa ser levado em consideração é que a maior parte das pacientes do estudo está na faixa etária de 30 a 39 anos. Nesse contexto, a noção de que a lesão precursora tem tempo de evolução que dura em torno de 10 a 20 anos, tem significado relevante e contribui para esse achado.

Nesse âmbito, não houve diferença significativa entre as médias de idade e os graus de classificação das lesões intraepiteliais cervicais, como também entre as médias de idade e a expressão dos biomarcadores ⁽¹⁹⁾. Assim, uma justificativa plausível é a forma variada pela qual a patologia se apresenta, uma vez que diversas condições como o estado de imunidade, fatores ambientais e a própria genética podem interferir no curso da evolução da doença ⁽¹⁷⁾.

Ademais, quanto ao grau de lesão em relação ao p16 e ki-67, quatorze pacientes foram classificados como alto grau, vinte pacientes como baixo grau e oito pacientes compuseram o grupo controle. Nesse quadro, analisando os dados decorrentes do p16 e ki-67, tais resultados eram esperados em virtude de uma maior prevalência de lesões de baixo grau em comparação às lesões de alto grau em pacientes não submetidos à terapia cirúrgica⁽²⁰⁾.

Posteriormente, os dados sobre a expressão do biomarcador p16 foram analisados individualmente, em que grande parte foi classificada como 0 ou negativa, visto que mais da metade dos casos foram classificados como de baixo grau ou grupo controle. Sendo assim, respeitando o processo fisiopatológico da lesão intraepitelial cervical, lesões de baixo grau ou ausência de lesão não são caracterizadas por um acúmulo do biomarcador no núcleo celular⁽¹⁰⁾, a maior partedas lâminas (61,9%) não expressou marcação para a proteína.

Em seguida, os dados sobre a expressão do biomarcador ki-67 foram analisados individualmente, a maioria foi classificada como menor que dez, já que nas lesões cervicais, a intensidade da expressão do Ki-67 correlaciona-se com o nível da lesão. Com isso, a imunorreatividade do Ki-67 foi vista em todas as amostras, pois se relaciona à evidência de proliferação celular, de forma que este marcador expressa-se em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0, na qual as células estão quiescentes⁽¹⁰⁾. Desse modo, em que todas as amostras apresentaram o biomarcador, sendo que dessas 57,1% foram classificadas como menores que dez.

Assim, por meio da correlação entre os graus de lesão intraepitelial do colo do útero e expressão imuno-histoquímica para a proteína p16, foi encontrada associação significativa entre os fatores, logo se a paciente em fase inicial apresentar superexpressão do marcador há maiores chances da evolução da lesão, no entanto para uma análise mais fidedigna o marcador ki-67 também deve ser analisado. Nesse contexto, todas as pacientes classificadas com expressão maior que cinquenta por cento eram do grupo de lesões de alto grau. Logo, esse resultado mantém concordância com os atuais estudos, nos quais a superexpressão de p16 é associada à progressão das lesões em neoplasias intraepiteliais de alto grau⁽¹⁹⁾.

Concomitantemente, a maior parte das lesões de alto grau foi marcada positivamente com o biomarcador p16, o que explica a alta especificidade do método. Nesse âmbito, o fato é explicado pela inatividade da proteína causada pela infecção persistente do vírus HPV nas células escamosas. Desse modo, há grande quantidade da proteína sem haver, no entanto, a interrupção do ciclo celular, o que permite a continuidade do processo neoplásico⁽¹⁰⁾.

No entanto, um caso classificado com lesão de alto grau apresentou expressão 0 ou negativa para p16. Destarte, presume-se que mesmo com um alto grau de neoplasia

intraepitelial cervical, não houve saturação da atividade da proteína p16 no ciclo celular, o que implica no não acúmulo deste supressor tumoral no núcleo e citoplasma celular. Ainda assim, o método deve ser utilizado por seu alto grau de especificidade para lesões avançadas, já que é um dos únicos biomarcadores com essa finalidade específica ⁽⁵⁾.

Analogamente, foi feita a correlação entre os graus de lesão intraepitelial do colo do útero e expressão imuno-histoquímica para a proteína ki-67, sendo o achado expressivo. Nesse contexto, todas as amostras classificadas com expressão maior que cinquenta por cento eram do grupo de lesões de alto grau e somente houve alto grau no grupo de incidência acima de 10 por cento. Ademais, no grupo de baixo grau a maioria das amostras teve percentual de expressão menor que dez e nenhuma maior que cinquenta. Logo, em lesões cervicais, a intensidade da expressão do ki-67 correlaciona-se com o nível da lesão ⁽²¹⁾.

Por conseguinte, o padrão de marcação para p16 e de ki-67 tem significativa correlação com o grau da lesão, assim, observa-se concordância com os demais estudos. Sendo que a positividade dos marcadores p16/ki-67 geralmente está associada à infecção por HPV de alto grau, com intensidade de moderada a alta para ambos. Assim, a dupla é efetiva para a triagem de pacientes com laudocitológico anormal ⁽¹¹⁾.

No entanto, analisando os biomarcadores simultaneamente, houve uma simultaneidade maior entre a expressão de ambos nas lesões de baixo grau se comparado às lesões de alto grau. Tal achado era esperado, visto que na amostra do estudo mais da metade dos casos foram classificados como de baixo grau ou grupo controle em relação ao p16 e todos os casos tiveram positividade em relação ao ki-67, mas é importante ressaltar que na literatura casos de alto grau apresentam maior expressão e sensibilidade de p16 e ki-67 em comparação com baixo grau ⁽¹¹⁾.

Além disso, a expressão de p16 foi correlacionada com o grau de displasia. Assim, a incidência de p16 em sua maioria foi zero em NIC I, já em NIC II os resultados foram em sua maioria progressivos. Por fim, ver-se que em NIC III nenhuma amostra resultou em zero na expressão de p16, somente em outras categorias, o que corrobora com a sua associação à lesão. Com isso, outros trabalhos constataram que o marcador imunohistoquímico p16 é mais preciso na identificação de lesões precursoras com exame citopatológico cervical compatível com NIC I/II, o que nessa pesquisa também foi notado. No entanto, o maior grau de displasia é imposto por NIC III, com isso espera-se que a incidência do marcador p16 acompanhe tal premissa, o que não foi observado de maneira expressiva ^(13,18).

Ademais, na expressão do ki-67 a maioria dos casos de NIC I teve expressão menor que dez por cento, já em NIC II a incidência só foi observada a partir de dez por cento, assim,

ver-se que a presença de ki-67 em NIC I e NIC II em amostras de colo uterino é um forte fator preditivo para graduação e progressão da doença, além de apresentar uma reprodutibilidade interobservador de 100% ⁽¹⁹⁾. Nesse contexto, em NIC III houve uma superexpressão do marcador (60,0%) nas amostras com mais que cinquenta por cento, mas quando se analisa numericamente em relação à expressão de dez a cinquenta, o total de lâminas caiu, assim, pode-se inferir que a uma sensibilidade alta do marcador ki-67 em relação à NIC III, no entanto a prevalência diminuiu.

Nesse âmbito, houve algumas limitações no estudo. Inicialmente, o estudo foi seccionado, não existindo tempo de acompanhamento das pacientes, fato que impede a associação de outros fatores para contribuir no entendimento de progressão das lesões. Desse modo, uma pesquisa de longo acompanhamento poderia definir melhor os quadros, principalmente aqueles nos quais havia dúvida diagnóstica.

Ademais, existe uma grande variabilidade de interpretação entre o observador à baixa reprodutibilidade dos critérios citomorfológicos, principalmente quanto ao uso de hematoxilina e eosina para o diagnóstico histológico das neoplasias intraepiteliais cervicais, bem como sua classificação nas categorias NIC I, II e III. No presente estudo, somente uma patologista avaliou todas as lâminas, podendo assim conter vieses de interpretação, minimizados com a análise de dois ou mais patologistas.

CONCLUSÃO

Esse estudo ressalta a importância da utilização da imuno-histoquímica nas proteínas p16 e ki-67, já que foi a correlação entre a incidência da expressão dos marcadores e o grau da lesão foi confirmada, principalmente em lesões de alto grau. Assim, em lesões de menor grau há menores quantidades de marcadores e em lesões de maior grau há um aumento da quantidade de marcadores, na maioria das amostras. Com isso, ratifica-se que podem melhorar o desempenho dos testes de detecção das lesões pré-cancerosas e auxiliar na identificação das mudanças que acontecem durante a progressão da lesão cervical, aprimorando os métodos de rastreamento atuais. Ademais, a faixa etária acometida está de acordo com a idade prevista para maior ênfase no rastreamento, no entanto essa variável não apresentou correlação significativa com o grau de progressão da lesão, uma vez que o estado de imunidade, fatores ambientais e a própria genética interferem no curso de evolução da doença. Além disso, houve relação estatisticamente significativa entre o grau de NIC segundo o ki-67, em que houve progressão da expressão do marcador e do grau de displasia, assim, a acurácia na identificação do grau das lesões pode ser elevada usando o marcador. Como perspectiva futura para ampliar a pesquisa está a inclusão de uma variabilidade maior das idades dos pacientes e o aumento no número de amostras.

REFERÊNCIAS

1. INCA. Parâmetros técnicos para o rastreamento do câncer do colo do útero - Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva; Maria Beatriz Kneipp Dias; Caroline Madalena Ribeiro (organizadores). - Rio de Janeiro: Inca, 2019.
2. INCA. Perguntas frequentes: HPV | INCA - Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 11]; Available from: <https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/hpv>
3. Silva VR da. O impacto da marcação imuno-histoquímica para p16 e ki-67 na reprodutibilidade diagnóstica das biópsias do colo uterino. *www.arcafiocruzbr* [Internet]. 2017 [cited 2023 Feb 24]; Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25222>
4. OMS. Classificação de tumores da Organização Mundial da Saúde. Patologia e Genética - Tumores da mama e órgãos genitais femininos. Organização Mundial da Saúde. Publicações científicas da IARC 2008 [cited 2023 Feb 24];(4):270.
5. Goulart APS, Gonçalves MAG, Da-Silva VD. Avaliação da expressão de Telomerase (hTert), Ki67 e p16 ink4a em lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2023 Feb 24];44(2):131–9. Available from: http://old.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-69912017000200131&script=sci_abstract&tlng=pt
6. INCA. Tipos de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Leucemia. 2020 [cited 2022 Feb 11]. p. Tipos de câncer. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>
7. Zhang X, Xu Y, Meng T, Shen D. Analysis of factors affecting the prognosis of patients with cervical intraepithelial neoplasia 2. *Oncology Letters*. 2020 Jun 9;20(2):1810–6.
8. Martin CM, O’Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* [Internet]. 2011 Oct [cited 2019 Apr 3];25(5):605–15. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693411000721>
9. Zhang X, Shen D. p16INK4a and Ki-67 measurement predict progression of cervical low-grade squamous intraepithelial lesion. *International journal of clinical and experimental pathology* [Internet]. 2018 [cited 2023 Feb 24];11(8):4109–16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6962782/>
10. da Costa LBE, Triglia RDM, Andrade LALDA. p16INK4a, Cytokeratin 7, and Ki-67 as Potential Markers for Low-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Progression. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2017 Jul;21(3):171–6.

11. Fonseca FV, Tomasich FDS, Jung JE, Maestri CA, Carvalho NS de, Fonseca FV, et al. O papel da expressão imunoistoquímica do P16ink4a e do P53 na predição da recorrência da nic-ag após tratamento por conização. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Feb 24];43(1):35–41. Available from: http://old.scielo.br/scielo.php?pid=S010069912016000100035&script=sci_arttext&tln g=pt
12. COTRAN, R.S. et al. *Bases Patológicas das Doenças*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
13. Munhoz NG. O uso dos marcadores moleculares (p16, Ki-67 e E-Caderina) em biópsias uterinas cervicais [Internet]. *bdtd.ibict.br*. 2009 [cited 2023 Feb 24]. Available from: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/FMRP_0ceb37e8a37adae0132821663f197c61
14. Santos Fernandes NF, Fidelis de Almeida P, De Brito Lima Prado NM, De Oliveira Carneiro Â, Ferreira dos Anjos E, Amorim Carvalho Paiva J, et al. Desafios para prevenção e tratamento do câncer cervicouterino no interior do Nordeste. *Revista Brasileira de Estudos de População* [Internet]. 2021 May 21 [cited 2022 Sep 20];38(0144):1–27. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbepop/a/VQbssGG5M9tfMj7vpnLmDCL/?format=pdf&lang=pt>
15. Carozzi F, Confortini M, Palma PD, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L, et al. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2008 Oct;9(10):937–45.
16. Sun H, Shen K, Cao D. Progress in immunocytochemical staining for cervical cancer screening. *Cancer Management and Research*. 2019 Feb;Volume 11:1817–27.
17. Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* [Internet]. 2016 Mar 1;76(Suppl 1):S49–55. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789103/>
18. Ghosh A, Nirupama M, Padmanabha N, Kini H. Assessment of p16 and Ki67 Immunohistochemistry Expression in Squamous Intraepithelial Lesion with Cytohistomorphological Correlation. *Iranian Journal of Pathology*. 2020 Oct 1;15(4):268–73.
19. Miyamoto S, Hasegawa J, Morioka M, Hirota Y, Kushima M, Sekizawa A. The association between p16 and Ki-67 immunohistostaining and the progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2023 Feb 24];134(1):45–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27233813/>

20. Lewitowicz P, Nasierowska-Guttmejer A, Rokita W, Adamczyk-Gruszka O, Gluszek S, Chrapek M, et al. HPV genotyping and p16/Ki-67 test significantly improve detection rate of high-grade cervical squamous intraepithelial lesion. *Archives of Medical Science*. 2020;16(1):87–93.
21. Silva VR da. O impacto da marcação imuno-histoquímica para p16 e ki-67 na reprodutibilidade diagnóstica das biópsias do colo uterino [Internet]. *bdt.d.ibict.br*. 2017 [cited 2023 Feb 24]. Available from: https://bdt.d.ibict.br/vufind/Record/CRUZ_8784233369b1190fda4f57e9a207f5ed

ANEXOS e APÊNDICES

ANEXO A: Termo de Autorização.



TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que os pesquisadores **GUILHERME GRAZIANY CAMELO DE CARVALHO, EVELINE BRANDÃO MADEIRA e SARA BRANDÃO DOS SANTOS**, estão autorizados a realizar neste estabelecimento o projeto de pesquisa "**O IMPACTO DA MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA P16INK4A E KI-67 NA PROGRESSÃO DO GRAU DE LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL UTERINA**", cujo objetivo geral é "Analisar o vínculo entre o grau de progressão histológica das neoplasias intraepiteliais cervicais uterinas e a expressão imuno-histoquímica para p16 e da ki-67".

Ressalto que estou ciente de que serão garantidos os direitos, dentre outros assegurados pela resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde:

- 1) Garantia da confidencialidade, do anonimato e da não utilização das informações em prejuízo dos outros;
- 2) Que não haverá riscos para o sujeito de pesquisa;
- 3) Emprego dos dados somente para fins previstos nesta pesquisa;
- 4) Retorno dos benefícios obtidos através deste estudo para as pessoas e a comunidade onde o mesmo foi realizado.

Informo-lhe ainda, que a pesquisa somente será iniciada após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, para garantir a todos os envolvidos os referenciais básicos da bioética, isto é, autonomia, não maleficência, benevolência e justiça.


Yassara Tahany S. Duarte Lima
Administradora
CRA - MA 08148

Atenciosamente,

Administradora do laboratório Histopath – Patologia e Citopatologia Diagnostica
(assinatura e carimbo)

Imperatriz-MA, 13 de setembro de 2021

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa – CEP-HUUFMA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O IMPACTO DA MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA P16INK4A E KI-67 NA PROGRESSÃO DO GRAU DE LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL UTERINA

Pesquisador: Guilherme Graziany Camelo de Carvalho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53411221.0.0000.5088

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.181.529

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1831426. Datado de 27/09/2021).

Introdução

O útero é um órgão muscular onde o feto se desenvolve. O câncer de útero pode se iniciar em diferentes partes do órgão, pode ocorrer em qualquer faixa etária, mas é mais comum em mulheres que já se encontram na menopausa (INCA 2019). Assim, é classificado como o terceiro tipo de tumor maligno mais frequente na população feminina e a quarta causa de morte por câncer em mulheres no Brasil. É o mais incidente na região Norte (26,24/100 mil) e o segundo nas regiões Nordeste (16,10/100 mil) e Centro-Oeste (12,35/100 mil) (INCA, 2020). O câncer de colo de útero não possui geralmente uma progressão rápida, permitindo o rastreamento, diagnóstico e tratamento de suas lesões precursoras, prevenindo o desenvolvimento extenso do câncer. Com isso, a detecção precoce do câncer é uma estratégia para encontrar um tumor numa fase inicial e, assim, possibilitar uma intervenção eficaz (INCA, 2019). Outra peça fundamental no seguimento e o tratamento adequados das lesões invasivas e precursoras do colo do útero são a reprodutibilidade diagnóstica dos exames citopatológicos e histopatológicos e o estabelecimento de mecanismos de controle de qualidade e de educação continuada dos profissionais envolvidos

nesses aspectos (SILVA, 2017). Na classificação de tumor cervical uterino, as lesões precursoras do câncer de colo uterino são classificadas como NIC I, II e NIC III (OMS, 2008). Essas são comumente associadas à infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV), com diversas diferenças de evolução da doença entre as pacientes, incluindo a gravidade dos casos (GOULART et al., 2017). Em meio a categorização dos tipos de HPV, 13 vertentes são consideradas oncogênicas com maior risco de provocar infecções persistentes e lesões precursoras. Nesse contexto, os tipos HPV-16 e HPV-18 são os principais encontrados no câncer de colo de útero, sendo verificados em até 70% dos casos (INCA, 2021). Anteriormente ao diagnóstico existe uma fase pré-clínica (sem sintomas) em que a detecção de lesões precursoras pode ser feita por meio do principal método de rastreio o exame preventivo, também conhecido como Papanicolau. Especificamente, o exame é indolor, simples e rápido, com ele é feita a inspeção do colo do útero e da região interior da vagina, além da coleta de células da endocérvice e da ectocérvice para que seja feita uma análise citopatológica. Os resultados podem variar de infecção pelo HPV ou lesão de baixo grau, alto grau, negativo para câncer e amostra insatisfatória (INCA, 2020). A definição de lesões consideradas precursoras do câncer de colo uterino é atribuída nas neoplasias intraepiteliais cervicais podendo ser de alto grau ou não. (ZHANG et al., 2020). Atualmente a menor taxa de concordância diagnóstica referente ao diagnóstico de lesões NIC 2, são classificadas de maneira errônea frequentemente, seja por subdiagnóstico ou por sobrediagnóstico. Tal fato também ocorre por que as lesões NIC grau 2 são identificadas como uma mistura de lesões transitórias e de lesões

verdadeiramente pre-cancerígenas (MARTIN e O'LEARY, 2011; ZHANG et al., 2020). Assim, é imprescindível a utilização de ferramentas para melhorar a reprodutibilidade diagnóstica (SILVA, 2017). Nesse contexto, dados científicos sugerem o uso de biomarcadores, como o p16 e o Ki-67, para auxílio no diagnóstico histopatológico e nos prognósticos das lesões intraepiteliais do colo uterino, pois somente o uso do marcador p16 tem

apresentado limitações do seu uso de rotina em todos os casos. Além disso, evidências apontam que o Ki-67 também pode auxiliar na definição

diagnóstica, no entanto não há determinantes suficientes para indicar em que situações estaria melhor indicada sua utilização (SILVA, 2017).A p16 é

uma proteína supressora tumoral responsável pelo bloqueio da atividade das kinases ciclo-dependentes CDK4/6, no ciclo celular está envolvida na

regulação da transição da fase G1-S. Com a inativação dessa proteína ocorrem mudanças no ciclo celular que resultam no seu acúmulo no núcleo e citoplasma das células afetadas pelo HPV e, conseqüentemente, permitindo a sua identificação na imuno-histoquímica (DA COSTA et al., 2017;

FONSECA, 2016). Com isso, essa proteína pode ser usada como um biomarcador, adicionando uma significativa precisão diagnóstica na avaliação de lesões cervicais, principalmente, em lesões de alto grau e para avaliar a probabilidade de progressão em lesões consideradas ainda de baixo risco. Nesse contexto, a porcentagem de expressão é proporcional ao grau de lesão cervical. (GOULART et al., 2017; ZHANG e SHEN, 2018). O Ki-67 é um marcador de proteína não-histônica de proliferação celular, sendo expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0, tem a função de se expressar em crescimento de tumores humanos sugerindo o grau de malignidade (ROBBINS E COTRAN, 2005). Nessa perspectiva, a positividade do Ki-67 na imuno-histoquímica demonstra uma crescente proliferação de lesões intraepiteliais de baixo e alto grau. Assim, há fortes evidências de que a p16 e Ki-67 tem correlação no reconhecimento do HPV associada às lesões cervicais pré-neoplásicas. Detalhadamente, a proliferação exagerada nas células malignas, que são marcadas pelo Ki-67, pode servir de diagnóstico para o câncer. Com isso, o Ki-67 parece ser um método promissor para o uso em patologia, por ter uma relação definida entre o ciclo celular, facilitando e permitindo análises relativamente simples e economicamente viáveis (MUNHOZ, 2009). A importância desse estudo é, portanto, a avaliação dos biomarcadores p16 e ki-67 na progressão da lesão cervical de baixo e alto graus, assim como as chances de diferenciá-las precocemente. Dessa maneira, os dados obtidos podem auxiliar no curso do quadro clínico, assim como contribuir no desfecho do diagnóstico, os quais implicam no impedimento de tratamentos desnecessários.

Hipótese:

- A expressão imuno-histoquímica da p16 e da ki-67 é concomitante a progressão de lesões neoplásicas.
- A expressão imuno-histoquímica da p16 e da ki-67 tem pouca ou baixa utilidade para diferenciar lesões de alto e baixo risco.

Metodologia Proposta:

Para o estudo, serão avaliados os laudos de pacientes submetidos ao exame imunohistoquímico para neoplasia intraepitelial cervical no Laboratório HISTOPATH de Imperatriz-MA, nos períodos entre agosto de 2019 e julho de 2021. Os laudos utilizados serão selecionados por conveniência, mediante contemplação dos critérios de inclusão e exclusão da pesquisa. Desse modo, dos laudos imunohistoquímico serão extraídas as informações referentes à classificação histológica do tumor e sua graduação histológica, levando em consideração a classificação de Bethesda 1988.

Concomitantemente, dos laudos dos exames imunohistoquímicos serão obtidos os dados acerca da presença dos biomarcadores ki-67 e p16 possibilitando a classificação molecular do tumor. Ademais, os casos com diagnóstico de NIC serão separados daqueles sem NIC. Assim, o grupo controle será formado por pacientes sem neoplasia intraepitelial cervical e a expressão do biomarcador p16 e ki-67 naquelas com lesão intraepitelial cervical será graduada pela sua intensidade. Posteriormente, os dados coletados serão avaliados estatisticamente através de Software específico, que possibilita o cruzamento de dados e, com isso, será possível avaliar a relação existente entre os marcadores prognósticos e fatores clinicopatológicos dos participantes da pesquisa. A população do estudo será composta pelos pacientes admitidos no Laboratório Histopath –

Patologia e Citopatologia Diagnóstica, um estabelecimento privado. A amostragem do estudo será estimada com base nos prontuários admitidos no local, em que por meio de uma consulta prévia no espaço, foram verificados 40 pacientes elegíveis.

Critério de Inclusão:

Nesse projeto, serão incluídos dados coletados a partir de prontuários de pacientes admitidos no período de agosto de 2019 a julho de 2021, devido a logística de processamento e armazenamento desses documentos, no laboratório referido que preencherem os critérios a seguir:

1. Pacientes adultos, do sexo feminino, acima de 18 anos, diagnosticados com neoplasia intraepitelial cervical.
2. Acompanhados no laboratório citado, enquadrados no período definido do estudo.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos os pacientes que, durante a análise do prontuário:

1. Apresentarem idade inferior a 18 anos.
2. Pacientes com biópsia apresentando material insuficiente ou com diagnóstico de carcinoma invasor.

Metodologia de Análise de Dados:

A obtenção dos dados será realizada através da análise de prontuários. Será utilizada a versão 16 do programa Microsoft Excel para a tabulação dos dados. Posteriormente, as análises estatísticas serão efetuadas com o programa Software Statistical Package for the Social Sciences 22.0 para

Windows (SPSS Inc. versão 22.0.0.0).

Desfecho Primário:

Espera-se, por meio dos resultados obtidos nessa pesquisa, que haja relação entre a expressão da proteína p16 e ki-67 e o grau de progressão histológico da neoplasia intraepitelial cervical, sendo identificadas porcentagens em ascensão de acordo com a gravidade da lesão. Dessa maneira, o projeto não apresenta, em um primeiro momento, implicações práticas diretas aos pacientes. Apesar disso, os dados obtidos podem colaborar

para o estabelecimento dos fatores que levam a mortalidade e necessidade de procedimentos cirúrgicos. Além disso, como a utilização desse método ainda é escassa na região para lesões intraepiteliais cervicais, espera-se uma contribuição para a área médica como uma possibilidade para um diagnóstico precoce, bem como para uma melhor diferenciação entre lesões de baixo e alto graus.

Tamanho da Amostra no Brasil: 40

Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)?

Não

Estudo é Multicêntrico no Brasil?

Não

Propõe dispensa do TCLE?

Sim

Justificativa:

Solicito, perante este Comitê de Ética em Pesquisa, a dispensada utilização do TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO –TCLE para a coleta de dados, tendo em vista que o mesmo utilizará somente informações obtidas a partir de laudos, em que o pesquisador não terá, em nenhum momento do estudo contato direto com o paciente. Nesses termos, me comprometo a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução CNS nº 466/12 e suas complementares.

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Não

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar o vínculo entre o grau de progressão histológico das neoplasias intraepiteliais cervicais uterinas e a expressão imuno-histoquímica para p16 e da ki-67.

Objetivo Secundário:

Averiguar a expressão imuno-histoquímica da p16 e da ki-67 em pacientes com pesquisa de HPV de alto grau positiva pela técnica de PCR. Estratificar a população acometida. Verificar a correlação entre os possíveis indicadores. Verificar grau de malignidade NIC com a presença dos marcadores p16 e k-67.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos possíveis de ocorrer são: divulgação de dados confidenciais e risco à segurança dos laudos analisados. Nesse contexto, para minimizá-los, serão aplicadas as normatizações de confidencialidade e de sigilo dos laudos dos pacientes contidas na Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Ademais, os nomes dos pacientes estarão em sigilo, pois a pesquisa será feita a partir do número da biópsia.

Benefícios:

Explanando os benefícios, a pesquisa permite, principalmente nos casos em que haja dúvida, uma possibilidade alternativa na terapêutica, para determinar a conduta de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical, com isso uma abordagem mais conservadora pode ser analisada em detrimento a métodos cirúrgicos possivelmente desnecessários. Ademais, essa conduta pode trazer benefícios e é pouco utilizada pelos profissionais especialistas da cidade, contribuindo assim para a ampliação das opções relacionadas ao diagnóstico precoce de uma questão de saúde pública ainda bastante frequente no país.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo relevante pois o câncer de colo de útero é o terceiro tipo de tumor maligno mais comum em mulheres e a quarta causa de morte por câncer em mulheres no Brasil. Nesse contexto, a neoplasia não possui geralmente uma progressão rápida, permitindo o rastreamento, diagnóstico

e tratamento de suas lesões precursoras, prevenindo o desenvolvimento extenso do câncer. Ademais, as lesões nomeadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) são identificadas como precursoras do câncer de colo uterino e seu diagnóstico precoce e preciso é fundamental para a escolha da melhor conduta. Desse modo, alguns biomarcadores, como o p16 e o Ki-67, estão sendo utilizados para auxílio no diagnóstico histopatológico e nos prognósticos das lesões intraepiteliais do colo uterino, pois somente o uso do marcador p16 tem apresentado limitações do seu uso de rotina em todos os casos. Apesar do avanço sobre o conhecimento em relação às lesões neoplásicas do colo uterino, ainda há uma alta taxa de discordância interobservador e um diagnóstico não tão claro em alguns tipos de lesões, nos quais pode haver erro terapêutico por conta de uma falha no momento de classificação. Desse modo, a importância do estudo a ser realizado é ampliar as alternativas para que as neoplasias intraepiteliais cervicais sejam identificadas e classificadas com maior eficiência, bem como a escolha terapêutica a ser realizada, implicando na diminuição dos malefícios causados as pacientes por um diagnóstico pouco elucidativo em uma região na qual o método imunohistoquímico para p16 e Ki-67 ainda é pouco utilizado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo apresenta documentos referente aos "Termos de Apresentação Obrigatória":

Folha de rosto, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada,

Termo de Dispensa do TCLE, Autorização do Gestor responsável do local para a realização da coleta de dados e Projeto de Pesquisa Original na íntegra em Word. Atende à Norma Operacional no 001/2013 (item 3/ 3.3).

Recomendações:

1. Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA sugere que os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

2. Atentar para o período da coleta de dados que não pode ser anterior à aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP. Cronograma discordante entre projeto na íntegra em word e PB: É necessário fazer revisão nas etapas do cronograma que consta no projeto em word, considerando a importância da sua unificação com o que consta no PB ONLINE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROTOCOLO não apresenta óbices éticos, portanto atende aos requisitos fundamentais

da Resolução CNS/MS nº 468/12 e suas complementares, sendo considerado APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa–CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.468/2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1831426.pdf	27/09/2021 11:42:18		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TCCSara1.docx	27/09/2021 11:40:24	sara brandão dos santos	Aceito
Brochura Pesquisa	TCCSara1.pdf	27/09/2021 11:34:05	sara brandão dos santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO.jpg	27/09/2021 11:25:32	sara brandão dos santos	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSATCLE.pdf	27/09/2021 11:22:31	sara brandão dos santos	Aceito
Folha de Rosto	Plataforma.pdf	27/09/2021 11:20:38	sara brandão dos santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

APÊNDICE A: Declaração do Fiel Depositário.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.

COORDENAÇÃO DE MEDICINA

TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO

Eu, Yássira Tabanny Sousa Duarte Lima
CPF: 029.825.803-06 Endereço: Rua Frei Epifânio, 1010,
Vila Nova, Imperatriz - MA, Cargo: Administradora


_____, fiel depositário da base de dados da instituição VIGILÂNCIA EM SAÚDE situada em IMPERATRIZ-MA, declaro que os pesquisadores **GUILHERME GRAZIANY CAMELO DE CARVALHO, EVELINE BRANDÃO MADEIRA e SARA BRANDÃO DOS SANTOS** estão autorizados a realizar nesta instituição o projeto de pesquisa "O IMPACTO DA MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA P16INK4A E KI-67 NA PROGRESSÃO DO GRAU DE LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL UTERINA", cujo objetivo geral é "Analisar o vínculo entre o grau de progressão histológico das neoplasias intraepiteliais cervicais uterinas e a expressão imuno-histoquímica para p16 e da ki-67".

Ressalto que estou ciente de que serão garantidos os direitos, dentre outros assegurados pela resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde:

- 1) Garantia da confidencialidade, do anonimato e da não utilização das informações em prejuízo dos outros;
- 2) Que não haverá riscos para o sujeito de pesquisa;
- 3) Emprego dos dados somente para fins previstos nesta pesquisa;
- 4) Retorno dos benefícios obtidos através deste estudo para as pessoas e a comunidade onde o mesmo foi realizado.

Informo-lhe ainda, que a pesquisa somente será iniciada após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, para garantir a todos os envolvidos os referenciais básicos da bioética, isto é, autonomia, não maleficência, benevolência e justiça.

Imperatriz, 13 de setembro de 2021.


Yássira Tabanny S. Duarte Lima
Administradora
CRA - MA 08148

(ASSINATURA E CARIMBO)

APÊNDICE B: Termo de Compromisso de Utilização de Dados.

**TERMO DE COMPROMISSO NA UTILIZAÇÃO DOS DADOS, DIVULGAÇÃO
E PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS DA PESQUISA**

O(s) pesquisador(es) do projeto "O IMPACTO DA MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA P16INK4A E KI-67 NA PROGRESSÃO DO GRAU DE LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL UTERINA" se comprometem a utilizar os dados coletados na pesquisa somente para fins científicos, garantindo divulgar e publicar os resultados encontrado sejam eles favoráveis ou não, resguardando os interesses dos sujeitos envolvidos, quanto ao sigilo e à confidencialidade.

Imperatriz, 10/09/2021



Prof. Dr. GUILHERME GRAZIANY CAMELO DE CARVALHO
Docente do curso de Medicina
Universidade Federal do Maranhão



Me. EVELINE BRANDÃO MADEIRA
Médica Patologista



SARA BRANDÃO DOS SANTOS
Discente do curso de Medicina

APÊNDICE C: Solicitação de Dispensa de TCLE.



SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: Impacto da marcação imuno-histoquímica para p16ink4a e ki-67 na progressão do grau de lesão intraepitelial cervical uterina.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Guilherme Graziany Camelo De Carvalho
Pesquisador: Sara Brandão Dos Santos

Eu, Guilherme Graziany Camelo De Carvalho, portador do CPF nº 012.856.223-40, pesquisador responsável pelo projeto "impacto da marcação imuno-histoquímica para p16ink4a e ki-67 na progressão do grau de lesão intraepitelial cervical uterina", solicito, perante este Comitê de Ética em Pesquisa, a dispensa da utilização do TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE para a coleta de dados, tendo em vista que o mesmo utilizará somente informações obtidas a partir de laudos, em que o pesquisador não terá, em nenhum momento do estudo contato direto com o paciente. Nesses termos, me comprometo a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução CNS nº 466/12 e suas complementares.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Guilherme', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat illegible.

Prof. Dr. Guilherme Graziany Camelo De Carvalho
Docente do curso de medicina
Universidade Federal do Maranhão