

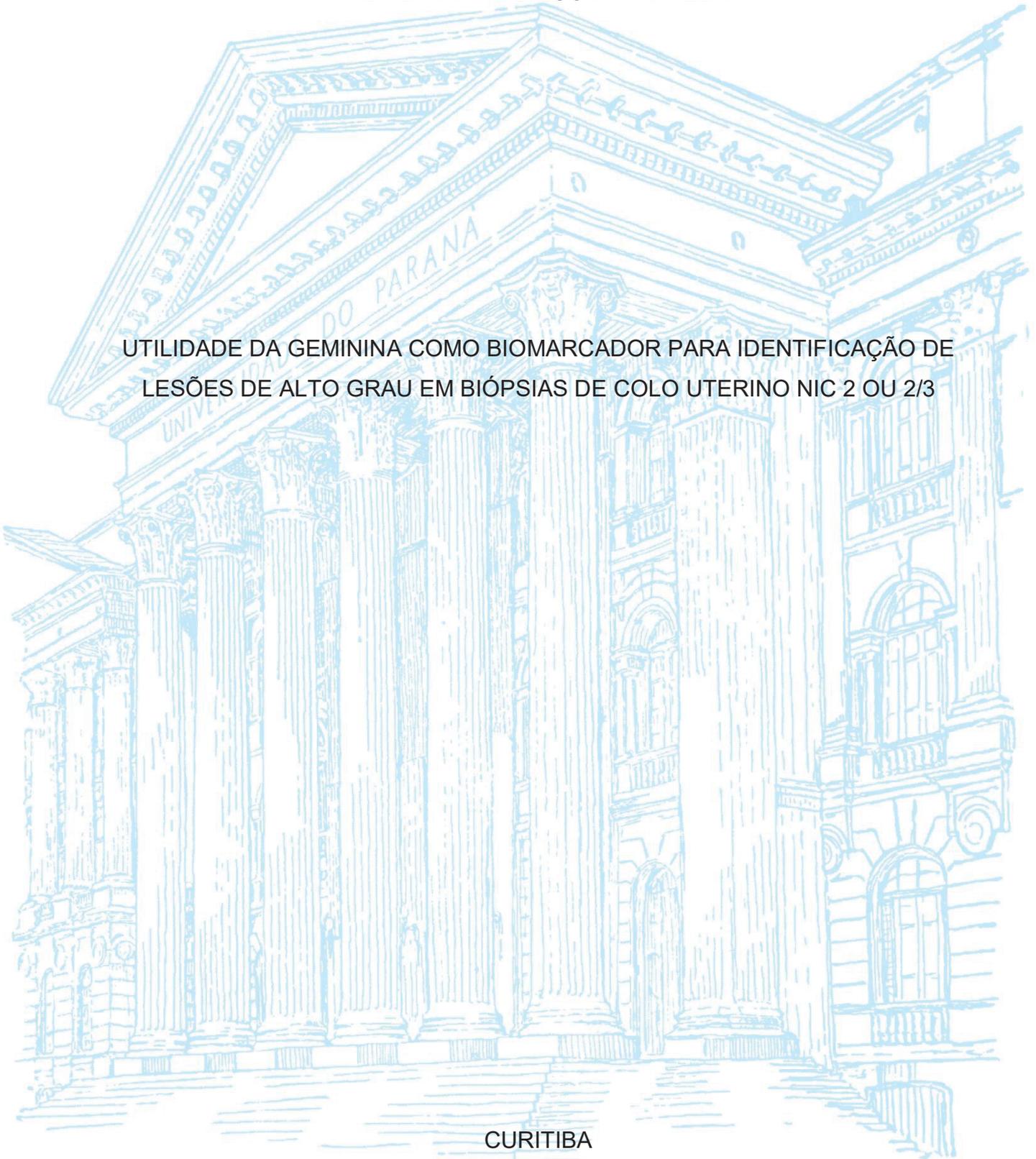
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE VIANNA DA COSTA KATZER

UTILIDADE DA GEMININA COMO BIOMARCADOR PARA IDENTIFICAÇÃO DE
LESÕES DE ALTO GRAU EM BIÓPSIAS DE COLO UTERINO NIC 2 OU 2/3

CURITIBA

2025



ALINE VIANNA DA COSTA KATZER

UTILIDADE DA GEMININA COMO BIOMARCADOR PARA IDENTIFICAÇÃO DE
LESÕES DE ALTO GRAU EM BIÓPSIAS DE COLO UTERINO NIC 2 OU 2/3

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para aprovação no mestrado.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Maira Zanine

CURITIBA
2025

Katzer, Aline Vianna da Costa
Utilidade da geminina como biomarcador para identificação de lesões de alto grau em biópsias de colo uterino NIC 2 ou 2/3 [recurso eletrônico] / Aline Vianna da Costa Katzer. – Curitiba, 2025.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação Tocoginecologia e Saúde da Mulher, 2025.

Orientadora: Rita Maira Zanine.

Bibliografia: p. 44-48.

1. Displasia do Colo do Útero – patologia. 2. Biópsia. 3. Lesões

NLMC:

Catálogo na fonte elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFPR, Biblioteca de Ciências da Saúde – SD, com os dados fornecidos pelo autor.

Bibliotecário: Francisco José Cordeiro CRB9/1734.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO TOCOGINECOLOGIA E
SAÚDE DA MULHER - 40001016084P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação TOCOGINECOLOGIA E SAÚDE DA MULHER da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALINE VIANNA DA COSTA KATZER** intitulada: **Utilidade da gemina como biomarcador para identificação de lesões de alto grau em biópsias de colo uterino NIC2 ou 2/3**, sob orientação da Profa. Dra. RITA MAIRA ZANINE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 03 de Dezembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
26/12/2024 09:25:12.0
RITA MAIRA ZANINE
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
30/12/2024 15:42:09.0
ANA PAULA MARTINS SEBASTIAO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/12/2024 15:34:50.0
JAN PAWEL ANDRADE PACHNICKI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

Assinatura Eletrônica
30/12/2024 11:33:07.0
CAMILA MARCON
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Eu dedico esta dissertação aos meus pais, Olivan e Gilza, e ao meu esposo, Cassio, que sempre estiveram me apoiando durante todo o processo.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças ao apoio e incentivo de diversas pessoas, às quais expresso minha mais profunda gratidão.

A Deus, por me conceder saúde, perseverança e forças para concluir esta etapa.

À minha orientadora, Dra. Rita Maira Zanine, pela paciência, orientação e dedicação ao longo de toda a pesquisa, sempre oferecendo conselhos valiosos e incentivos.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia Avançada, que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À minha família pelo amor incondicional, pelo apoio emocional e por compreenderem os momentos de ausência durante esta jornada. Em especial ao Cassio, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pacientes, que diariamente me ensinam mais sobre a prática médica e me inspiram a continuar estudando e aprimorando meu conhecimento.

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo suporte e pelos recursos disponibilizados para a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação se tornasse realidade.

Muito obrigada.

Tudo posso naquele que me fortalece (Filipenses 4:3).

RESUMO

O câncer de colo do útero, apesar de potencialmente evitável, permanece como uma importante causa de morbimortalidade, principalmente em países em desenvolvimento. Diante disso é importante realizar rastreamento eficaz para diagnóstico e tratamento de lesões precursoras do câncer de colo do útero. Em casos de dúvida diagnóstica histopatológica, principalmente quando o resultado é neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 2, marcadores de oncogenicidade têm sido utilizados para confirmação diagnóstica. O único biomarcador validado é o p16, por indicar transformação relacionada ao HPV-HR, porém, como ele também pode marcar algumas células não displásicas, outros biomarcadores têm sido estudados, e um deles, o Ki67, um marcador de proliferação celular, já tem sido utilizado de forma complementar ao p16 para aumentar o desempenho diagnóstico. Para além disso, esse estudo avaliou a geminina como uma possível alternativa para identificar lesões com potencial de progressão quando o resultado histopatológico da biópsia do colo uterino for NIC 2 ou NIC 2/3. Foram selecionadas 229 pacientes que haviam sido submetidas a biópsia de lesões do colo do útero com diagnóstico NIC 2 ou NIC 2/3 e que posteriormente passaram por tratamento cirúrgico excisional. O grupo caso foi formado de 107 pacientes após concordância por dois patologistas das biópsias NIC 2 ou NIC 2/3. O grupo controle foi formado por pacientes submetidas à histerectomia total por patologia benigna. A análise estatística identificou alta sensibilidade (0,84) e baixa especificidade (0,10) da geminina; e baixa sensibilidade (0,67) e alta especificidade (1,00) para o p16. Além disso, para aumentar a objetividade da análise, a coloração em camadas pela imunohistoquímica foi avaliada e comparada ao resultado histopatológico da cirurgia excisional, através desses dados, foram calculadas as sensibilidades e especificidades de cada marcador considerando a coloração dos marcadores em camadas. Os resultados dos três marcadores demonstraram taxas estatisticamente iguais, aumentando o desempenho individual quando utilizados em conjunto e praticamente iguais ao utilizar p16/Ki67 (0,783 e 0,946) ou p16/geminina (0,753 e 0,938). Assim, apresentamos um potencial biomarcador para auxiliar no diagnóstico e na decisão terapêutica, diminuindo o sobretratamento cirúrgico em pacientes com lesões potencialmente não progressivas apesar do resultado histopatológico NIC 2 ou NIC 2/3 e a chance de desfechos obstétricos ruins no caso de mulheres sem prole definida, independentemente de sua idade ao diagnóstico.

Palavras-chave: Lesões precursoras de câncer de colo uterino; biomarcadores; geminina; p16; Ki67.

ABSTRACT

Cervical cancer, although potentially preventable, remains an important cause of morbidity and mortality, especially in developing countries. Therefore, it is important to perform effective screening for the diagnosis and treatment of cervical cancer precursor lesions. In cases of histopathological diagnostic uncertainty, especially when the result is cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2, oncogenicity markers have been used for diagnostic confirmation. The only validated biomarker is p16, as it indicates transformation related to HPV-HR. However, as it can also mark some non-dysplastic cells, other biomarkers have been studied, and one of them, Ki67, a marker of cell proliferation, has already been used as a complement to p16 to increase diagnostic performance. In addition, this study evaluated geminin as a possible alternative to identify lesions with potential for progression when the histopathological result of cervical biopsy is CIN 2 or CIN 2/3. Two hundred and twenty-nine patients who had undergone biopsy of cervical lesions diagnosed as CIN 2 or CIN 2/3 and who subsequently underwent excisional surgical treatment were selected. The case group consisted of 107 patients after agreement by two pathologists on CIN 2 or CIN 2/3 biopsies. The control group consisted of patients who underwent total hysterectomy due to benign pathology. Statistical analysis identified high sensitivity (0.84) and low specificity (0.10) for geminin; and low sensitivity (0.67) and high specificity (1.00) for p16. In addition, to increase the objectivity of the analysis, layered staining by immunohistochemistry was evaluated and compared to the histopathological result of excisional surgery. Using these data, the sensitivities and specificities of each marker were calculated considering the staining of the layered markers. The results of the three markers demonstrated statistically equal rates, increasing individual performance when used together and practically equal when using p16/Ki67 (0.783 and 0.946) or p16/geminin (0.753 and 0.938). Thus, we present a potential biomarker to aid in diagnosis and therapeutic decision-making, reducing surgical overtreatment in patients with potentially non-progressive lesions despite the histopathological result of CIN 2 or CIN 2/3 and the chance of poor obstetric outcomes in the case of women with no defined offspring, regardless of their age at diagnosis.

Keywords: Precursor lesions of cervical cancer; biomarkers; geminin; p16; Ki67.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FLUXOGRAMA 1 – FLUXOGRAMA DE SELEÇÃO DAS PACIENTES DO GRUPO CASO.....	27
TABELA 1 – VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS DOS GRUPOS CASO E CONTROLE	30
TABELA 2 – AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA DOS RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DOS PROCEDIMENTOS EXCISIONAIS ANTES E APÓS A REVISÃO PELOS PATOLOGISTAS	31
TABELA 3 – CÁLCULO DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE	32
TABELA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADO HISTOPATOLÓGICO DE CAF/CONE E COLORAÇÃO EM CAMADAS DOS MARCADORES P16, KI67 E GEMININA	33
TABELA 5 – CÁLCULO DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA CONSIDERANDO A COLORAÇÃO DOS MARCADORES EM CAMADAS	33
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MARCADORES DOIS A DOIS.....	34
TABELA 7 – COMBINAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ENTRE OS MARCADORES.....	35
TABELA 8 – RESULTADOS DA ASSOCIAÇÃO DA GEMININA COM IDADE NO GRUPO CASO	35

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CAF	- Cirurgia de alta frequência
CEC	- Carcinoma escamocelular
HPV	- Papilomavírus humano
HR-HPV	- Papilomavírus humano de alto risco oncogênico
HSIL	- <i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i>
INCA	- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IST	- Infecções sexualmente transmissíveis
LAST	- <i>Lower Anogenital Squamous Terminology</i>
LSIL	- <i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
NIC	- Neoplasia intraepitelial cervical
Rb	- Proteína do retinoblastoma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA	15
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo geral	16
1.2.2 Objetivos específicos	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS	17
2.2 LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS.....	18
2.3 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS.....	19
2.4 BIOMARCADORES	20
2.4.1 O p16.....	21
2.4.2 O Ki67.....	22
2.4.3 Os novos biomarcadores	22
2.4.4 A geminina.....	23
3 METODOLOGIA	25
3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	25
3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	25
3.3 ESTIMATIVA DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	25
3.4 CARACTERÍSTICAS DA SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	26
3.5 FLUXOGRAMA	27
3.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	28
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS	30
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	49

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero é um dos cânceres ginecológicos mais comuns, uma causa relevante de morbimortalidade e potencialmente evitável, o que justifica a importância de se realizar um rastreamento eficaz. O objetivo do rastreamento é identificar possíveis lesões precursoras do câncer de colo do útero a partir da análise citológica de uma amostra de material cervicovaginal. Quando necessário, a colposcopia e a análise histopatológica a partir de biópsia complementam a investigação de lesões precursoras do câncer de colo do útero potencialmente invasivas.

As lesões precursoras do câncer do colo do útero são lesões proliferativas classificadas de acordo com a extensão do acometimento do epitélio escamoso cervical em neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) 1, 2 ou 3. Quando a displasia acomete somente a camada basal, classificamos a lesão como NIC 1, já a NIC 2 e a NIC 3 acometem até o terço médio e até o terço superior do epitélio, respectivamente (Mitra *et al.*, 2016).

De acordo com o Consenso LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology*), a NIC 2 foi considerada como uma lesão de alto grau, porém ela é a lesão de curso clínico e comportamento biológico menos compreendidos. O mesmo Consenso refere que, entre as lesões diagnosticadas como NIC 2 pela histopatologia, algumas podem regredir e outras progredir para doenças invasivas. Por isso, ela acaba não sendo distinguida com segurança e o resultado é uma alta taxa de variabilidade interobservador para diagnóstico histopatológico dessas lesões (Chia; Fayle; Sobowale, 1993; Darragh *et al.*, 2013; Waxman *et al.*, 2012).

Além disso, diferentemente das lesões NIC 3, as lesões NIC 2 têm alta taxa de regressão espontânea. Uma revisão sistemática e metanálise concluiu que a maioria das lesões NIC 2, principalmente em mulheres jovens com menos de 30 anos, tem regressão espontânea (46%) em 12 meses. Outros estudos também demonstraram taxas de regressão altas de até 63% em 24 meses (Lycke *et al.*, 2023; Tainio *et al.*, 2018).

Assim, embora as estimativas de prognóstico baseadas na histopatologia sejam extremamente úteis para interpretar amostras de biópsias, são necessários marcadores de oncogenicidade confiáveis para minimizar o risco de diagnóstico incorreto nas pacientes com lesão potencialmente invasivas dentre aquelas com

diagnóstico histopatológico NIC 2 ou NIC 2/3. Esses marcadores são utilizados para esclarecer interpretações histológicas e aumentar a precisão do diagnóstico. Por isso, indica-se a complementação diagnóstica por meio do estudo imuno-histoquímico a partir de marcadores celulares de oncogenicidade para identificação de lesões de alto grau no colo uterino (Aizawa *et al.*, 2012; Klaes *et al.*, 2002).

O atual biomarcador padrão-ouro para diferenciar as lesões de baixo e alto grau quando o resultado histopatológico de biópsias de lesões do colo uterino é NIC 2 é o p16. O marcador de proliferação celular Ki67 pode auxiliar nessa diferenciação. Porém o papel do Ki67 é limitado pela variação nos métodos analíticos utilizados para avaliação imuno-histoquímica e pela falta de consenso sobre o ideal ponto de corte para a prática clínica, variando de 1-28,6% na literatura (Sundara Rajan *et al.*, 2014; Xing; Wang; Wu, 2017).

Por isso, novos biomarcadores estão sendo estudados para auxiliar na identificação de lesões de alto grau. Um desses novos biomarcadores é a geminina, também considerada um marcador de proliferação celular que tem um importante papel na fisiologia do câncer e no seu desenvolvimento. Sua expressão aumentada foi associada a cânceres como o de mama, o colorretal e o pulmonar e seu pior desfecho clínico (Aizawa *et al.*, 2012; Di Bonito *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2004; Haruki *et al.*, 2011; Montanari *et al.*, 2005; Nishihara *et al.*, 2009; Sundara Rajan *et al.*, 2014).

A importância do diagnóstico correto e diferenciação das lesões NIC 2 que podem regredir se justifica para evitar o tratamento excessivo dessas lesões. Uma vez que o tratamento excessivo, por meio da exérese da zona de transformação, causando encurtamento do colo do útero, aumenta o risco de resultados reprodutivos negativos em gestações subsequentes, como o trabalho de parto prematuro, ruptura prematura de membranas ovulares e perdas gestacionais precoces. Como o pico da incidência das neoplasias intraepiteliais cervicais ocorre por volta dos 30 anos, quaisquer possíveis efeitos desse tratamento em futuras gestações são de particular importância, já que muitas mulheres nessa idade ainda não têm prole definida (Arbyn *et al.*, 2008; Galgano *et al.*, 2010; Kristensen; Langhoff-Roos; Kristensen, 1993; Lycke *et al.*, 2023).

Metanálises avaliaram o risco relativo de mortalidade perinatal, parto prematuro e baixo peso ao nascer associados ao tratamento prévio de lesões precursoras do câncer do colo do útero e concluíram que o tratamento excisional foi

associado a um risco aumentado de mortalidade perinatal, baixo peso ao nascer (pelo aumento do risco de ruptura prematura de membranas ovulares) e parto prematuro, mais grave no caso de conização a frio, por excisar mais tecido do que no caso do uso da alça (Arbyn *et al.*, 2008; Kyrgiou *et al.*, 2006).

1.1 JUSTIFICATIVA

Como o câncer de colo do útero é um dos cânceres mais comuns, é importante incentivar o rastreamento da população-alvo para identificação de suas lesões precursoras a partir da análise citológica de uma amostra de material cervicovaginal, com realização de colposcopia e análise histopatológica, se indicado, objetivando o tratamento mais adequado.

Como há uma alta taxa de discordância interobservador e intraobservador para a análise histopatológica das biópsias de lesões visualizadas à colposcopia, a sua associação com biomarcadores têm sido uma forma de melhorar a acurácia diagnóstica e promover o tratamento adequado, principalmente para mulheres jovens, sem prole definida, em que a cirurgia pode causar maus desfechos obstétricos (por exemplo, trabalho de parto prematuro, ruptura prematura de membranas ovulares e perdas gestacionais precoces) (Arbyn *et al.*, 2008; Darragh *et al.*, 2013; Kyrgiou *et al.*, 2006).

Os marcadores usados atualmente para a diferenciação entre lesões potencialmente regressivas ou invasivas são o p16 e o Ki67, sendo o p16 o único validado através do Consenso LAST. Em nosso trabalho, estudamos a geminina, um marcador já utilizado para essa diferenciação em outros tecidos (por exemplo, mama, pulmão e intestino), como um novo marcador dessa diferenciação em lesões do colo do útero, quando há dúvida diagnóstica, com o objetivo de complementar os marcadores atualmente utilizados.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a sensibilidade e especificidade da geminina na diferenciação entre lesões de baixo e alto grau em pacientes com diagnóstico de NIC 2 ou 2/3.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Comparar a sensibilidade e especificidade da geminina com os marcadores p16 e Ki67 para a diferenciação entre lesões de baixo e alto grau do colo do útero.
2. Avaliar se há variação na positividade da geminina para a diferenciação entre lesões de baixo e alto grau do colo do útero para faixas etárias específicas (< ou > de 25 anos).
3. Avaliar se a geminina pode ser utilizada como marcador adicional para auxiliar no diagnóstico histopatológico de NIC 2 ou NIC 2/3.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS

O HPV pertence à família Papillomaviridae, gênero *Papillomavirus*. São vírus não envelopados, com genoma circular de DNA de fita dupla divididos em baixo e alto risco de oncogenicidade. Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados e cerca de 40 tipos infectam o trato genital feminino. Os genes virais E1 e E2 medeiam diretamente a replicação do genoma viral, enquanto E4, E5, E6 e E7 são proteínas acessórias que coordenam a amplificação e a virulência do genoma viral. Os genes L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo viral necessárias para os estágios finais da montagem do vírion e medeiam a entrada viral em futuras células hospedeiras (Faraji *et al.*, 2017; Melo; Uttagawa, 2021; Sano; Oridate, 2016).

As células hospedeiras para a infecção pelo HPV estão localizadas na camada basal do epitélio escamoso estratificado. Os vírus são incorporados às células hospedeiras da camada basal, o material genético viral vai até o núcleo onde vai ser replicado juntamente com os cromossomos do hospedeiro. Quando as células-filhas infectadas deixam a camada basal do epitélio, após divisão celular, o HPV inicia a fase produtiva do ciclo de vida viral que requer a maquinaria de síntese de DNA celular (Faraji *et al.*, 2017; Sano; Oridate, 2016).

Existem quase 15 tipos de HPV de alto risco oncogênico (HPV-HR), identificados com lesões pré-cancerosas e cancerígenas. Os tipos de HPV de alto risco codificam alelos virulentos de duas proteínas virais, E6 e E7, que conferem potencial oncogênico. As proteínas E6 do HPV-HR se ligam e inativam a proteína p53, consequentemente bloqueando o processo de apoptose e fazendo com que as células infectadas percam o controle, proliferando de forma desordenada. A oncoproteína E7 do HPV tem como alvo o retinoblastoma (Rb) para a sua degradação, liberando fatores de transcrição mitogênicos que ativam a proliferação viral e aumentam a expressão do p16, que tenta bloquear o ciclo celular, mas sem sucesso. Por isso, quanto maior o acúmulo de p16 ao longo da espessura do epitélio estratificado do colo do útero, maior é a lesão causada pelo HPV. Assim, a expressão de E6 e E7 desregula o controle do ciclo celular para permitir a amplificação do genoma viral nas células (Faraji *et al.*, 2017; Melo; Uttagawa, 2021; Sano; Oridate, 2016).

A relação causal do HPV no desenvolvimento das lesões cervicais é inquestionável. Os subtipos do HPV de alto risco estão associados ao câncer cervical. Os principais genótipos desse grupo são 16, 18, 31 e 45, responsáveis por 80% dos cânceres do colo do útero (Martin; O'leary, 2011).

Nem todos os pacientes infectados pelo vírus apresentam a mesma evolução da doença, uma vez que esse comportamento está ligado a fatores ambientais, imunidade, genética do hospedeiro e fatores celulares. Por isso, apesar da exposição frequente das mulheres ao HPV, o desenvolvimento do câncer do colo do útero é relativamente raro, pois a maioria das anormalidades cervicais de baixo grau está associada à replicação viral benigna e regride espontaneamente sem a necessidade de tratamento. Por esse motivo, a identificação do DNA HPV-HR nem sempre será uma boa forma de avaliar o potencial de uma lesão precursora de evoluir para um carcinoma invasivo (Martin; O'leary, 2011; Silva *et al.*, 2017).

2.2 LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS

O câncer de colo do útero é precedido por uma longa fase bem definida de doença pré-invasiva, que geralmente é assintomática, caracterizada microscopicamente como uma série de eventos que progridem de atipia celular a vários graus de displasia, pelo acúmulo de alterações genéticas, antes da progressão para o carcinoma invasivo (Calil *et al.*, 2014).

Nenhuma característica clínica específica indica a presença de lesões precursoras do câncer de colo do útero. O diagnóstico inicial é feito por análise citológica de uma amostra de material cervicovaginal, complementada, se necessário, pela visualização direta de lesões pela colposcopia (Martin; O'leary, 2011; Sasieni; Castanon; Cuzick, 2009).

Para confirmação diagnóstica, é realizado exame histopatológico por meio de biópsia da lesão do colo do útero. O diagnóstico histopatológico é considerado o padrão-ouro para a diferenciação entre as lesões de baixo e alto grau do colo do útero. Porém, apesar dos critérios bem definidos existentes, há grande variação interobservador e intraobservador na interpretação histopatológica das lesões biopsiadas do colo do útero. Isso, porque essa avaliação pode ser afetada por diversas alterações celulares como inflamação, gravidez, atrofia e terapias hormonais, as quais

podem imitar lesões cervicais pré-malignas tornando subjetivas as abordagens tradicionais da histologia cervical (Aslani *et al.*, 2013).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS

Foram utilizadas diversas classificações para as displasias cervicais ao longo da história. A classificação histológica de Richart (1973) foi a que primeiro utilizou o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC). De acordo com essa classificação, as NICs podem ser classificadas em tipo 1, 2 ou 3 dependendo da extensão do envolvimento epitelial em amostra histopatológica (Inca, 2016; Richart, 1973).

A NIC 1 está associada à replicação viral benigna e tem taxa de regressão de 70-80%, podendo chegar até a 90% de regressão em mulheres jovens com menos de 25 anos. Por outro lado, anormalidades de alto grau, especificamente a NIC 3, têm um potencial muito maior de progredir para o câncer invasivo, chegando a 40% de progressão. No entanto, uma proporção de NIC de alto grau também irá regredir ou persistir, e isso está relacionado à crescente evidência de que nem todas as lesões de alto grau, em particular as NIC 2, são lesões pré-cancerosas verdadeiras (Aslani *et al.*, 2013; Martin; O'leary, 2011; Xing; Wang; Wu, 2017).

Uma outra maneira de classificar as displasias cervicais se baseia no Consenso LAST. Nessa classificação, as lesões morfológicas de colo uterino HPV-induzidas devem ser divididas somente em duas categorias biológicas: (1ª) lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), que consiste em infecção produtiva de partículas virais de menor risco biológico, com células proliferantes sem atipias significativas e que acometem o terço inferior do epitélio; e (2ª) lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), caracterizada por lesão proliferativa de células epiteliais relacionada à infecção transformante neoplásica, de maior risco biológico, caracterizada por marcante proliferação de células com maior desorganização já acometendo o terço médio ou a metade superficial do epitélio. Diante disso, o diagnóstico diferencial entre lesões de baixo e alto grau – se o patologista estiver considerando a classificação antiga NIC 2 – deve ser feito por meio de imuno-histoquímica com o marcador p16, que também pode ser utilizado em caso de divergência profissional na interpretação da amostra histológica, apoiando o sistema de classificação de dois níveis (Darragh *et al.*, 2013; Waxman *et al.*, 2012).

Para haver uma equivalência na terminologia diagnóstica de NIC – universalmente utilizada – com a terminologia do Consenso LAST, NIC 1 foi associada aos casos de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e NIC 2 e 3 aos casos de lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) (Darragh *et al.*, 2013; Waxman *et al.*, 2012).

Como a classificação de NIC 2 tem o diagnóstico controverso pela dificuldade para distinção entre LSIL e HSIL, lesões que se enquadram nessa categoria necessitam de propedêutica complementar na tentativa de melhor avaliar o seu risco biológico (Darragh *et al.*, 2013; Waxman *et al.*, 2012).

Por esse motivo, o diagnóstico preciso dessas lesões precursoras do câncer de colo do útero é um desafio, principalmente na transição de NIC 2 para NIC 3, justificando a necessidade de abordagens alternativas que possam minimizar a discordância entre os analistas, auxiliando na classificação das lesões para identificar a verdadeira doença de alto grau e determinar o risco de sua progressão (Martin; O'leary, 2011; Melo; Utgawa, 2021; Silva *et al.*, 2017).

2.4 BIOMARCADORES

Biomarcadores ou marcadores biológicos são características que podem ser medidas de forma precisa e reprodutível. Na medicina, são sinais objetivos e quantificáveis com relação de causa e efeito entre a característica e o organismo, por exemplo, a pressão arterial é um biomarcador da hipertensão arterial (Strimbu; Tavel, 2010).

Com os avanços em biologia molecular e perfil de expressão gênica, foram descobertos biomarcadores relacionados às alterações celulares, bioquímicas e/ou moleculares mensuráveis em tecidos, células ou fluidos, inclusive relacionados à carcinogênese, que nada mais é do que a regulação aberrante da proliferação celular e diferenciação de moléculas relacionadas ao ciclo celular. Isso facilitou a triagem, a detecção precoce, o gerenciamento e a terapia direcionada e personalizada para os mais diversos tipos de cânceres e suas lesões precursoras (Hulka, 1991; Martin *et al.*, 2009; Siril *et al.*, 2019).

Nesse aspecto, os biomarcadores seriam proteínas ou genes que regulam a duplicação do DNA durante um ciclo celular e que podem ser expressos diferencialmente em câncer, lesões precursoras ou tecido normal. Por isso, têm sido usados na triagem, para estimar prognóstico, para avaliar resposta ao tratamento e

para complementar diagnósticos duvidosos, evitando tratamentos desnecessários ou prevenindo tratamento de lesões que podem ser potencialmente inativas (Calil *et al.*, 2014; Nankivell; Mehanna, 2011; Tachibana; Gonzalez; Coleman, 2005).

Alguns biomarcadores foram descritos para NIC e câncer de colo do útero, um deles envolvido em alterações moleculares induzidas pelo HPV. Eles têm como objetivo identificar genes diferencialmente expressos em doenças cervicais pré-malignas e malignas. Inclusive, alguns desses marcadores já foram testados e validados, tendo potencial para auxiliar no diagnóstico e prognóstico de lesões em biópsias do colo do útero. Destes, os mais amplamente utilizados são o p16 e o Ki67 (Aslani *et al.*, 2013; Martin; O'leary, 2011).

A geminina, por sua vez, foi estudada recentemente como uma possibilidade de biomarcador para diferenciação entre lesões de baixo e alto grau no colo uterino com maior especificidade do que os biomarcadores atualmente utilizados para essa finalidade, o p16 e o Ki67 (Xing; Wang; Wu, 2017).

2.4.1 O p16

O p16 é uma proteína inibidora de quinase dependente de ciclina que regula o ciclo celular. As oncoproteínas E7 do HPV-HR levam à proliferação celular anormal e superexpressão de p16, que pode ser detectado por imuno-histoquímica e, por isso, é um marcador acurado para esse evento (Waxman *et al.*, 2012; Xing; Wang; Wu, 2017).

Evidências mostram que uma interpretação combinada da avaliação anatomopatológica por meio de hematoxilina e eosina combinada com a coloração de p16 é uma boa abordagem para melhorar a precisão diagnóstica, oferecendo mais segurança aos patologistas (Hariri; Øster, 2007; Martin; O'leary, 2011).

O p16 é o único marcador oficialmente validado pelo Consenso LAST para, entre outras funções, diferenciar uma amostra histopatológica em LSIL ou HSIL (Darragh *et al.*, 2013; Waxman *et al.*, 2012).

Portanto, para fazer a interpretação diagnóstica de NIC 2, podemos utilizar o p16. Sua positividade favorece a possibilidade de se tratar de uma lesão potencialmente não regressiva, possivelmente HSIL. A negatividade para o mesmo marcador favoreceria tratar-se de lesão de menor risco biológico, possivelmente LSIL (Waxman *et al.*, 2012).

Apesar disso, o p16 pode ser encontrado em lesões inflamatórias do colo do útero sem necessariamente estarem associadas às lesões de alto grau (Xing; Wang; Wu, 2017).

2.4.2 O Ki67

O Ki67 é um marcador de proliferação celular comumente utilizado para avaliar a atividade proliferativa de células tumorais. Ele está confinado à camada de células parabasais da mucosa escamosa estratificada normal do colo do útero, mas mostra expressão no epitélio escamoso estratificado em lesões de NIC de acordo com a extensão da maturação desordenada. Ele é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0. Apesar de ser utilizado como auxiliar na classificação da NIC, não se acredita que esteja envolvido especificamente no processo carcinogênico do colo do útero. Há evidências sugerindo que seja superior à graduação histopatológica padrão para prever a progressão da NIC e é altamente sensível para diferenciar entre NIC 1 e NIC 2 ou 3, mas a imunocoloração do Ki67 é variável e menos específica em muitos casos (Aizawa *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2017; Xing; Wang; Wu, 2017; Yagi *et al.*, 2016).

Dessa forma, a sua expressão em esfregaços de colo do útero ou em tecidos obtidos por biópsias tem sido sugerida como um marcador alternativo de progressão. A imunopositividade para Ki67 parece refletir a relação entre a ação proliferativa, o grau da lesão e a expressão de proteínas do HPV. Também pode ser útil para distinguir graus das lesões, aumentando a precisão do diagnóstico e reduzindo significativamente a variabilidade interobservador (Walts; Bose, 2009).

Essa diferenciação auxiliaria na conduta para tratamento cirúrgico versus expectante, facilitando a decisão em casos mais difíceis, como em pacientes jovens sem prole definida, e potencialmente reduzindo a frequência de procedimentos excisionais desnecessários em pacientes portadoras de lesões de menor risco biológico (Waxman *et al.*, 2012).

2.4.3 Os novos biomarcadores

Apesar dos biomarcadores auxiliarem os patologistas a realizarem diagnósticos, muitas vezes eles acabam não sendo introduzidos no repertório de

exames de rotina da patologia ginecológica pela falta de padronização para utilizá-los, já que a literatura utiliza anticorpos diferentes e com diferentes interpretações da intensidade da coloração para considerá-los positivos.

Além disso, uma limitação da análise do p16 como marcador de neoplasia do colo do útero é que a expressão focal e ocasionalmente difusa também pode ser observada em células não displásicas, entre elas, células endometriais, metaplásicas e endocervicais, além da metaplasia tubo-endometriode (Hariri; Øster, 2007; Martin; O'leary, 2011; Silva *et al.*, 2017).

Por isso, atualmente, existem estudos buscando novos marcadores que podem identificar as lesões de colo do útero de pior prognóstico com alta sensibilidade e especificidade. O objetivo desses estudos é melhorar a acurácia diagnóstica e identificar as pacientes que necessitam de tratamento para evitar a progressão da doença. Um desses novos biomarcadores é a geminina, que foi pensada como uma alternativa para a complementação diagnóstica, uma vez que é um marcador de proliferação muito utilizado em outros sítios, como a mama (Xing; Wang; Wu, 2017).

2.4.4 A geminina

A geminina é uma pequena proteína de 209 aminoácidos (23 a 25 kDa), localizada no sexto cromossomo, exclusiva de organismos multicelulares e que desempenha papel fundamental na coordenação da replicação do DNA e da divisão celular. Para isso, ela inibe a atividade de proteínas envolvidas na regulação da duplicação do genoma e da expressão gênica, prevenindo a replicação prematura do DNA, pela sua ligação direta ao Cdt1, e garantindo estabilidade e integridade genômica (Champeris Tsaniras *et al.*, 2018; Depamphilis, 2011; Kingsbury *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2011; Suchyta; Miotto; MCGarry, 2015; Xing; Wang; Wu, 2017).

A expressão da geminina oscila durante o ciclo celular com altos níveis sendo detectados em S, G2 e na primeira parte da mitose, aumentando à medida que o ciclo celular progride e diminuindo quando as células saem do ciclo celular. Logo, ela está presente em células proliferativas, ou seja, em células normais com divisão ativa e em células malignas. Estando, inclusive, em maior quantidade em células cancerígenas do que em células normais (Depamphilis, 2011; Haruki *et al.*, 2011; Montanari *et al.*, 2005; Shomori *et al.*, 2010; Shrestha *et al.*, 2007; Sundara Rajan *et al.*, 2014; Wohlschlegel *et al.*, 2002).

Sendo superexpressa em vários tumores humanos, ela pode evitar a reinicialização da replicação do DNA e consequente formação de danos no material genético dessas células, o que as levaria à apoptose. Além disso, alterações na expressão da geminina estão associadas com proliferação celular, diferenciação e desenvolvimento. Diante disso, foi considerada um marcador tumoral e foi proposto que inibidores de moléculas pequenas dirigidos contra a geminina poderiam ter utilidade como agentes anticancerígenos seletivos, já que resultariam em inibição da proliferação celular das células tumorais sem afetar as células normais (Depamphilis, 2011; Di Bonito *et al.*, 2012; Patmanidi *et al.*, 2017; Sankar *et al.*, 2017; Xing; Wang; Wu, 2017).

Nesse sentido, vários estudos mostraram que a geminina tem um importante papel na fisiologia do câncer e no seu desenvolvimento. Sua expressão diferenciada foi associada a cânceres, como o de mama, o colorretal e o pulmonar e seu pior desfecho clínico (Aizawa *et al.*, 2012; Di Bonito *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2004; Haruki *et al.*, 2011; Montanari *et al.*, 2005; Nishihara *et al.*, 2009; Sundara Rajan *et al.*, 2014).

3 METODOLOGIA

Estudo de coorte retrospectivo, observacional, transversal.

Foi submetido e aprovado no Comitê de Ética do CHC (CAAE 57779722.0.0000.0096) (Anexo 1).

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes do Setor de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia da UFPR, que estavam sendo acompanhadas por lesão no colo do útero induzida pelo HPV, retiradas de banco de dados eletrônico de janeiro/2009 a junho/2022. Essas pacientes foram submetidas à biópsia com diagnóstico histopatológico NIC 2 ou NIC 2/3 e, posteriormente, submetidas a tratamento cirúrgico excisional (exérese da zona de transformação por CAF ou conização) e tiveram seus resultados de diagnósticos histopatológicos da biópsia e cirurgia confirmados após revisão das lâminas por dois patologistas da Unidade de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR.

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão foram perda de seguimento após biópsia de lesão de colo uterino, registro incompleto no prontuário, pacientes imunossuprimidas ou gestantes.

3.3 ESTIMATIVA DO TAMANHO DA AMOSTRA

O cálculo amostral foi realizado para comparação da sensibilidade (ou especificidade) de dois testes diagnósticos utilizando a metodologia de Tilaki (2014). Os valores de referência de sensibilidade e especificidade foram obtidos do trabalho intitulado “Expression of geminin, p16, and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues” (Xing; Wang; Wu, 2017).

As proporções esperadas para sensibilidade (Se) dos dois testes diagnósticos utilizadas para realização dos cálculos foram 95% (Ki67) e 87,5% (p16). A seleção dos dois marcadores anteriores se deve ao fato de a sensibilidade da geminina (90%)

estar entre os dois valores anteriores. Para o cálculo amostral, fixou-se o nível de significância de 5% e o poder de teste em 80%.

O tamanho da amostra necessário para detectar uma diferença de 7,5% do valor da presunção de $Se = 95\%$ é 222 participantes. Levando em consideração uma perda de segmento de 10%, a amostra final é de 245, sendo 214 para o grupo de caso e 31 para o grupo controle. A definição do tamanho dos grupos teve como base o valor de sensibilidade do p16. A mesma ideia de cálculo foi realizada para comparar especificidades, resultando em valores menores de tamanho da amostra, e optou-se por selecionar um tamanho amostral maior, conforme descrito anteriormente, uma vez que já atenderia o limite mínimo de amostras necessárias para comparação da especificidade.

3.4 CARACTERÍSTICAS DA SELEÇÃO DA AMOSTRA

As pacientes foram identificadas por meio de base de dados eletrônica que contém todas as pacientes com alterações patológicas e acompanhadas no Setor de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal Paraná (UFPR), coletadas de janeiro/2009 a junho/2022.

Foram selecionadas aquelas com diagnóstico NIC 2 ou NIC 2/3 como resultado do exame histopatológico da biópsia da lesão de colo uterino e que foram posteriormente submetidas a tratamento cirúrgico excisional (exérese da zona de transformação com CAF ou conização).

76 pacientes que tinham o prontuário incompleto e que as lâminas tinham sido descartadas ou não encontradas no Arquivo da Unidade de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFPR foram excluídas do estudo.

Dentre as pacientes restantes, todas as lâminas das biópsias foram conferidas por um segundo patologista e, se o resultado fosse discrepante em relação ao primeiro, houve uma nova conferência com terceiro patologista, ficando no estudo somente aquelas que foram confirmadas como NIC 2 ou NIC 2/3.

Foram coletadas as seguintes variáveis demográficas dessas pacientes: idade, história pregressa de ISTs não HPV, tabagismo, menopausa, sexarca, número de parceiros sexuais e contracepção.

O grupo controle foi selecionado a partir de peças de pacientes da Unidade de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR que haviam sido submetidas

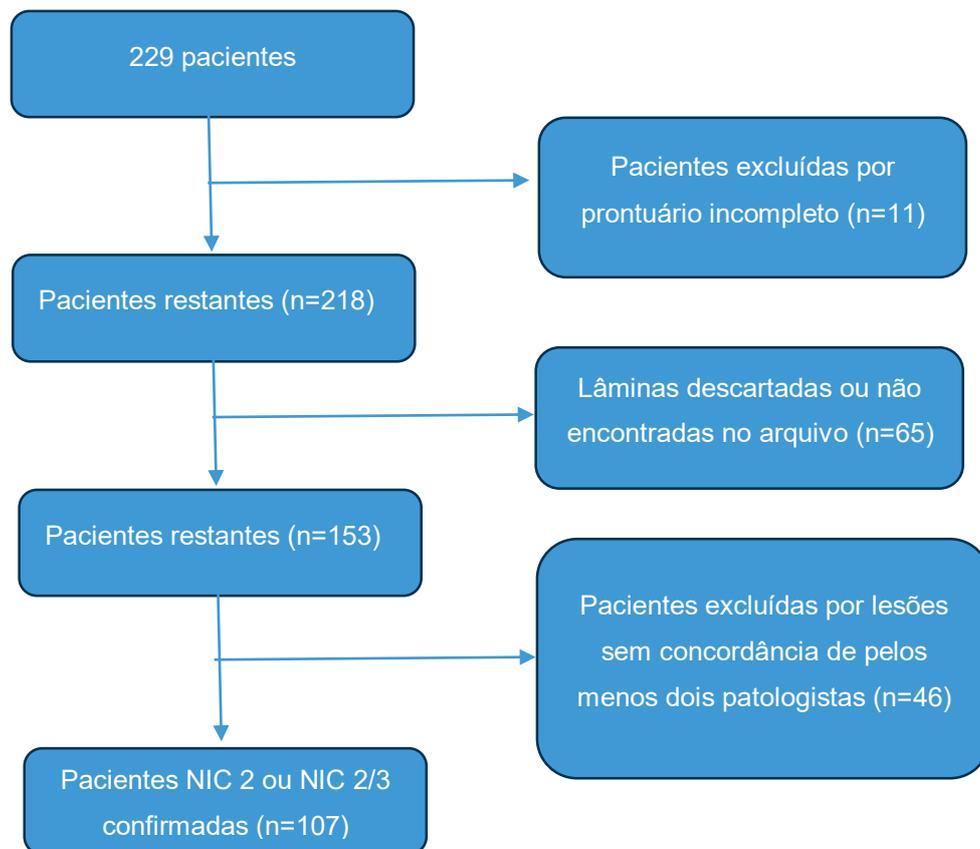
a histerectomia total por patologia benigna, por exemplo, miomatose uterina ou adenomiose, e que não tinham histórico prévio de lesão intraepitelial do colo do útero, de acordo com a análise de seus prontuários.

O padrão de referência para considerar as lesões do colo do útero como de alto grau foi a histologia NIC 2 ou mais das peças após a exérese da zona de transformação por CAF ou conização a frio, por isso, esse foi um critério de inclusão.

Utilizamos a idade de 25 anos como ponto de corte para avaliar a possibilidade da geminina ser um bom marcador para identificação de lesões potencialmente invasivas dentre as NIC 2, porque esse é o ponto de corte preconizado pelo Ministério da Saúde para iniciar o rastreamento das lesões intraepiteliais cervicais do colo do útero que poderiam progredir para o câncer de colo do útero.

3.5 FLUXOGRAMA

FLUXOGRAMA 1 – FLUXOGRAMA DE SELEÇÃO DAS PACIENTES DO GRUPO CASO



NOTA: N pretendido = 214 / Amostra recrutada = 229 / Amostra utilizada = 107
 FONTE: A autora (2024).

3.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Todas as lâminas dos casos e controles foram avaliadas por imunohistoquímica para os marcadores p16, Ki67 e geminina conforme o procedimento técnico descrito a seguir.

As amostras dos blocos de parafina, fixadas com formalina 10%, foram cortadas com 3-5 micras em lâminas silanizadas, processadas manualmente, desparafinizadas em xilol e desidratadas em etanol. Foram feitos a recuperação antigênica com tampão de EDTA pH 9.0 por 40 minutos, o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido a 10% por 10 minutos e o bloqueio de proteína com bloqueador de proteínas não específicas (albumina bovina 2%) por 10 minutos. As amostras foram incubadas em geladeira durante a noite com um anticorpo primário previamente diluído em 1:600 para a geminina (Clone1A8/Abcam São Paulo, SP), 1:100 para o Ki67 (Clone SP6/Invitrogen São Paulo, SP) e 1:100 para o p16 (Clone BC42/Biocare São Paulo, SP). O método de detecção foi o HRP-Polymer Detection. O sistema de revelação foi por Cromógeno Diaminobenzidina (DAB). O meio de montagem utilizado foi o Entellan. Posteriormente, foi feita a contracoloração das amostras com Hematoxilina e, então, estas foram examinadas por microscopia de luz.

As lâminas de imunohistoquímica para o p16 foram divididas em casos com expressão elevada do marcador (coloração em bloco, nuclear e citoplasmático em um segmento contínuo de ao menos 6 células envolvendo a camada basal e parabasal) e sem expressão elevada do marcador. Os que tiveram expressão elevada do marcador foram divididos em bloco focal (coloração focal em bloco, nuclear e citoplasmático em um segmento contínuo de ao menos 6 células envolvendo a camada basal e parabasal) e bloco difuso (coloração de toda a lesão em bloco, nuclear e citoplasmático em um segmento contínuo envolvendo a camada basal e parabasal); e também foram divididos em B/P (coloração nuclear e citoplasmática apenas nas camadas basal e parabasal), B/P/I (coloração nuclear e citoplasmática apenas nas camadas basal, parabasal e intermediária) e T (coloração nuclear e citoplasmática de todas as camadas da ectocérvice – basal, parabasal, intermediária e superficial).

Para o Ki67, as lâminas foram consideradas com expressão elevada do marcador de acordo com a porcentagem de núcleos positivos para o marcador, ou seja, com coloração acastanhada (>10% de coloração). As que tiveram expressão elevada do marcador foram divididas em camadas: B (coloração nuclear apenas na

camada basal), B/P (coloração nuclear apenas nas camadas basal e parabasal), B/P/I (coloração nuclear apenas nas camadas basal, parabasal e intermediária) e T (coloração nuclear de todas as camadas da ectocérvice – basal, parabasal, intermediária e superficial).

Para a geminina, as lâminas foram classificadas de acordo com a porcentagem de núcleos positivos para o marcador, ou seja, com coloração acastanhada (>20% de coloração). As que tiveram expressão elevada do marcador foram divididas em camadas: B (coloração nuclear apenas na camada basal), B/P (coloração nuclear apenas nas camadas basal e parabasal), B/P/I (coloração nuclear apenas nas camadas basal, parabasal e intermediária) e T (coloração nuclear de todas as camadas da ectocérvice – basal, parabasal, intermediária e superficial).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação dos marcadores de imuno-histoquímica (IHQ) e idade foram realizadas por meio do Teste Qui-quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fisher. As comparações entre as variáveis qualitativas emparelhadas foram realizadas a partir do teste de homogeneidade marginal. As medidas de sensibilidade, especificidade e acurácia e seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram calculados para cada um dos marcadores de imuno-histoquímica. As métricas elencadas também foram obtidas para os cenários das combinações dos marcadores IHQ. Testes de hipótese para comparar os resultados de dois testes de diagnóstico binários foram realizados usando as técnicas descritas por Roldán-Nofuentes (2020). As análises foram executadas na linguagem computacional R, versão 4.3.2. (Roldán-Nofuentes, 2020).

4 RESULTADOS

A tabela 1 fornece uma visão geral das variáveis demográficas dos 107 casos e 31 controles.

TABELA 1 – VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS DOS GRUPOS CASO E CONTROLE

Variável	Caso		Controle	
	Nº	Freq.(%)	Nº	Freq.(%)
Idade do diagnóstico				
Maior ou igual a 25 anos	86	80,00	31	100,00
Menor que 25 anos	21	20,00	0	0,00
História progressa de IST não HPV				
Não	84	78,5	7	22,58
Sim	17	15,89	1	3,23
Sem informação	6	5,61	23	74,19
Tabagismo				
Não	64	59,81	27	87,1
Sim	42	39,26	2	6,45
Sem informação	1	0,93	2	6,45
Menopausa				
Não	101	94,39	28	90,32
Sim	6	5,61	3	9,68
Sexarca				
Maior ou igual a 14 anos	93	86,92	6	19,35
Menor que 14 anos	9	8,41	2	6,45
Sem informação	5	4,67	23	74,2
Número de parceiros sexuais				
0	0	0	1	3,23
1, 2 ou 3	43	40,19	1	3,23
4 ou 5	20	18,69	0	0
6, 7, 8 ou 9	10	9,35	0	0
Maior ou igual a 10	19	17,76	0	0
Sem informação	15	14,01	29	93,54
Contraceção				
Nenhuma	35	32,71	4	12,9
Hormonal	44	41,12	17	54,84
Não hormonal	28	26,17	9	29,03
Sem informação	0	0	1	3,23

FONTE: A autora (2024).

No grupo caso, 80% das pacientes tinham mais de 25 anos; 78,5% declararam nunca ter apresentado qualquer tipo de Infecção Sexualmente Transmissível (IST) não HPV descrita em prontuário; 59,81% se declararam não tabagistas; 94,39%

estavam no período de menacme; 86,92% relataram que na primeira relação sexual elas tinham menos de 14 anos; 40,19% afirmaram que tiveram até três parceiros sexuais; e 41,12% usavam contraceptivo hormonal.

No grupo controle, todas as pacientes tinham mais de 25 anos; 22,58% disseram nunca ter apresentado qualquer tipo de IST não HPV; 87,1% não eram tabagistas; 90,32% estavam na menacme; e 54,84% usavam contracepção hormonal. As informações não estavam disponíveis nos prontuários de 74,2% das pacientes em relação à idade da sexarca; 74,19% em relação a IST; e 93,54% em relação ao número de parceiros sexuais.

TABELA 2 – AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA DOS RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DOS PROCEDIMENTOS EXCISIONAIS ANTES E APÓS A REVISÃO PELOS PATOLOGISTAS

Antes da Revisão	Após revisão									P-valor
	Negativo/ reacional	NIC 1	NIC 2	NIC 3	NIC 2/3	CEC microinvasor	HSIL	CEC queratinizante	CEC invasor	
Negativo/reacional	14	0	1	0	1	0	1	0	0	<0,001
NIC 1	4	3	1	0	0	0	0	0	0	
NIC 2	1	2	23	0	1	0	0	0	0	
NIC 3	1	0	15	2	13	0	0	0	0	
NIC 2/3	0	0	6	1	6	0	0	0	0	
CEC microinvasor	0	0	2	0	4	1	0	0	0	
HSIL	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
CEC queratinizante	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
CEC invasor	0	0	0	0	0	1	0	0	0	

NOTA: Teste de homogeneidade marginal (nível de significância de 5%)

FONTE: A autora (2024).

Na tabela 2, comparamos o resultado da análise histopatológica das cirurgias para exérese da zona de transformação por CAF ou conização antes e após a revisão dos patologistas, com o objetivo de determinar se haveria concordância entre os patologistas. As células sombreadas destacam a concordância exata entre os dois diagnósticos. A concordância foi descartada após essa análise.

Na tabela 3, temos o cálculo da sensibilidade, especificidade e acurácia dos marcadores p16, Ki67 e geminina em relação aos controles (peças do colo do útero sem lesão). Para o p16, a sensibilidade foi 0,67, sua especificidade 1,0 e a acurácia 0,74. O Ki67 teve como resultados 0,86 para sensibilidade, 0,90 para especificidade

e 0,86 para acurácia. A sensibilidade da geminina foi de 0,84, sua especificidade de 0,10 e sua acurácia de 0,67.

TABELA 3 – CÁLCULO DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
p16	0,67 (0,57; 0,76)	1,00 (0,89; 1,00)	0,74 (0,66; 0,81)
Ki67	0,86 (0,78; 0,92)	0,90 (0,74; 0,98)	0,86 (0,80; 0,92)
Geminina	0,84 (0,75; 0,90)	0,10 (0,02; 0,26)	0,67 (0,58; 0,74)

NOTA: 95% IC = intervalo de confiança de 95%

FONTE: A autora (2024).

Na tabela 4, comparamos as camadas do epitélio que apresentaram marcação (1 quando o marcador corou apenas o terço inferior do epitélio ou camadas basal e parabasal; 2 quando o marcador corou o terço inferior e médio ou as camadas basal, parabasal e intermediária; e 3 quando o marcador corou até o terço superior, ou seja, todo o epitélio ou as camadas basal, parabasal, intermediária e superficial) com seu posterior resultado histopatológico da peça retirada durante o procedimento de exérese da zona de transformação por CAF ou cone. O esperado era que, quando o marcador corasse apenas o terço inferior do epitélio, o resultado fosse NIC 1; caso a coloração atingisse o terço médio, o resultado fosse NIC 2; e se a coloração atingisse o terço mais superficial do epitélio, o resultado histopatológico fosse NIC 3. A análise para p16 foi estatisticamente significativa e demonstrou que a maior parte dos resultados de alto grau pela hematoxilina e eosina (NIC 2 ou mais) tinham a coloração pelo marcador pelo menos até o terço médio do epitélio ou a camada intermediária. Isso sendo verificado também para os marcadores Ki67 e geminina, apesar de nesses casos o resultado não ter sido estatisticamente significativo.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADO HISTOPATOLÓGICO DE CAF/CONE E COLORAÇÃO EM CAMADAS DOS MARCADORES P16, KI67 E GEMININA

CAF/Cone	p16			P-valor	Ki67			P-valor	Geminina			P-valor
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
NIC 1	0	2	0	0,010	0	2	0	0,9802	0	2	0	0,1033
NIC 2	3	30	4		2	22	13		5	21	11	
NIC 3	1	17	3		0	12	9		4	11	6	

FONTE: A autora (2024).

A tabela 5 mostra a sensibilidade, especificidade e acurácia para a determinação da positividade dos marcadores de acordo com as camadas que foram coradas. Para o p16 a sensibilidade foi de 0,55; a especificidade de 0,78; e acurácia de 0,55. O Ki67 teve a sensibilidade de 0,52; a especificidade de 0,76; e acurácia de 0,52. Já para a geminina tivemos a sensibilidade de 0,45; especificidade de 0,73; e acurácia de 0,45.

TABELA 5 – CÁLCULO DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA CONSIDERANDO A COLORAÇÃO DOS MARCADORES EM CAMADAS

	Sensibilidade (%) —	Especificidade (%)	Acurácia (%)
p16	0,55 (0,42; 0,68)	0,78 (0,66; 0,88)	0,55 (0,42; 0,68)
Ki67	0,52 (0,39; 0,64)	— 0,76 (0,65; 0,87)	0,52 (0,39; 0,64)
Geminina	0,45 (0,32; 0,58)	— 0,73 (0,61; 0,84)	0,45 (0,32; 0,58)

NOTA: 95% IC = intervalo de confiança de 95%.

FONTE: A autora (2024).

Na tabela 6, comparamos os valores de sensibilidade e especificidade dos marcadores, quando usamos a coloração em camadas, dois a dois. A hipótese global de que as sensibilidades e especificidades eram iguais para os marcadores dois a dois foi confirmada para todos os tipos de combinações que fizemos.

TABELA 6 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MARCADORES DOIS A DOIS

	Sensibilidade (95% CI)	Especificidade (95% CI)		
p16	0,55 (0,42; 0,68)	0,78 (0,66; 0,88)		
Ki67	0,52 (0,39; 0,64)	0,76 (0,65; 0,87)		
Hipótese Global	Se1 = Se2 & Sp1 = Sp2		P-valor	0,999
p16	0,55 (0,42; 0,68)	0,78 (0,66; 0,88)		
Geminina	0,45 (0,32; 0,58)	0,73 (0,61; 0,84)		
Hipótese Global	Se1 = Se2 & Sp1 = Sp2		P-valor	0,345
Ki67	0,52 (0,39; 0,64)	0,76 (0,65; 0,87)		
Geminina	0,45 (0,32; 0,58)	0,73 (0,61; 0,84)		
Hipótese Global	Se1 = Se2 & Sp1 = Sp2		P-valor	0,999

FONTE: A autora (2024)

Na tabela 7, combinamos a sensibilidade e especificidade dos marcadores e percebemos que aumentamos tanto a sensibilidade quanto a especificidade ao agruparmos os três marcadores ou o p16 com o Ki67 ou com a geminina, sendo que a sensibilidade e especificidade da combinação do p16 com o Ki67 é muito semelhante à combinação do p16 com a geminina.

TABELA 7 – COMBINAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ENTRE OS MARCADORES

Combinações	Sensibilidade do teste combinado	Especificidade do teste combinado
p16 Ki67 Geminina	0,880	0,985
p16 Ki67 -	0,783	0,946
p16 - Geminina	0,753	0,938

FONTE: A autora (2024).

A tabela 8 mostra que a marcação imuno-histoquímica com a geminina tem o mesmo padrão independentemente da idade da paciente (menor ou maior que 25 anos).

TABELA 8 – RESULTADOS DA ASSOCIAÇÃO DA GEMININA COM IDADE NO GRUPO CASO

Variável	Classe	Menor que 25 anos	Maior ou igual a 25 anos	P-valor
		Nº(%)	Nº(%)	
Geminina	POSITIVO	4 (20)	16 (13,79)	0,469
	NEGATIVO	16 (80)	100 (86,21)	

NOTA: Teste Qui-quadrado de Pearson (nível de significância de 5%)

FONTE: A autora (2024).

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, a maioria das mulheres do grupo caso tinha 25 anos ou mais e estava na menacme. As mulheres do grupo caso tinham biópsia de lesão do colo do útero com resultado histopatológico NIC 2 ou NIC 2/3 e a maior parte dessas mulheres teve resultado histopatológico NIC 2 ou mais após a exérese da zona de transformação por CAF ou conização. Esse resultado é compatível com a informação do Ministério da Saúde, por meio do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (2021), em 2021, de que antes dos 25 anos prevaleceriam as infecções por HPV e as lesões de baixo grau, que regredem espontaneamente em maior número dos casos. Além disso, após os 65 anos, se a mulher tiver feito os exames preventivos regularmente, com resultados normais, o risco de desenvolvimento do câncer cervical uterino é reduzido por ter evolução lenta, o que também é compatível com o fato de a maioria das mulheres do grupo caso estar na menacme (Inca, 2021).

A porcentagem de mulheres que referiu já ter apresentado IST não HPV foi maior no grupo caso do que no grupo controle. Esse dado é compatível com diversos estudos que avaliaram a associação entre ISTs e carcinogênese do HPV, o primeiro deles, de Schmauz *et al.* (1989), tanto pelo mecanismo da infecção por outra IST favorecer o mecanismo de infecção pelo HPV como pelo fato de que quanto mais a mulher estiver exposta a outras ISTs, mais também estará ao HPV (Castellsagué; Muñoz, 2003; Schmauz *et al.*, 1989).

Uma maior quantidade de mulheres se disse tabagista no grupo caso do que no grupo controle. Esse dado é compatível com a associação estatisticamente significativa de estudos caso-controle do tabagismo com as lesões precursoras de alto grau do câncer de colo do útero e o câncer de colo do útero. Já foram descritos alguns mecanismos para essa relação, como: a interação do HPV com a fumaça do cigarro, afetando diversas vias de sinalização envolvidas na iniciação, promoção e progressão do câncer; o aumento da expressão de E6 e E7 e a alteração das respostas imunes inatas e adaptativas contra o HPV pela fumaça do cigarro; e algumas substâncias específicas da fumaça do cigarro que aumentam a replicação do HPV nas células do colo uterino. O risco de carcinoma cervical uterino aumenta em fumantes de acordo com o número de cigarros fumados por dia e com a idade mais jovem ao começar a fumar, de acordo com uma metanálise publicada pela Revista Internacional de Câncer

em 2006 (Aguayo *et al.*, 2020; Castellsagué; Muñoz, 2003; International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2006).

A maioria das mulheres do grupo caso usava como método contraceptivo um método hormonal. Isso é relevante se levarmos em conta uma metanálise publicada no *Lancet*, em 2007, que avaliou 24 estudos em todo o mundo e constatou que o uso de contraceptivos orais hormonais aumenta o risco relativo de câncer de colo do útero invasivo e *in situ*. Porém, no grupo controle, a maior parte também usava um método contraceptivo hormonal e não apresentou, até o momento, lesões precursoras do câncer do colo do útero. Dessa forma, entendemos que esse fator isolado não é determinante para o aparecimento de lesões (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2009).

Com relação ao comportamento sexual, no que diz respeito à idade de início da vida sexual, ao número de parceiros sexuais e às ISTs não HPV, notamos uma alta porcentagem de falta de informação no prontuário das pacientes do grupo controle. Por isso, apesar de termos estudos com aumento do risco relativo para câncer do colo do útero quanto menor a sexarca (<14 anos) e com maior número de parceiros ao longo da vida, devemos interpretar esses dados com cautela (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2007).

A longa fase de doença pré-invasiva resulta em lesões precursoras do câncer do colo do útero, classificadas de acordo com a extensão do acometimento do epitélio escamoso cervical. Quando a displasia acomete somente o terço inferior do epitélio, classificamos a lesão como NIC 1; já a NIC 2 e a NIC 3 acometem até o terço médio e até o terço superior do epitélio, respectivamente (Mitra *et al.*, 2016).

A NIC 2 foi considerada como uma lesão de alto grau juntamente com a NIC 3 pelo consenso LAST, porém ela é uma mistura de doença pré-cancerosa e de baixo grau que pode ser distinguida com base na morfologia histopatológica, mas, em casos de dúvida diagnóstica, podemos utilizar marcadores de oncogenicidade. Isso auxilia a diminuir a alta taxa de variabilidade interobservador para diagnóstico histopatológico dessas lesões. De acordo com Waxman *et al.* (2012), houve concordância entre patologistas e revisores quando o resultado era NIC 2 em até 43% dos casos; sendo que para a NIC 3 a concordância foi de até 84% dos casos. Apoiando esses resultados, a variabilidade interobservador na análise histopatológica das peças de exérese da zona de transformação por CAF ou cone foi alta. Essa informação foi identificada em nosso estudo pela avaliação da concordância dos resultados

histopatológicos antes e após a revisão pelos patologistas (Chia; Fayle; Sobowale, 1993; Waxman *et al.*, 2012).

Assim, para auxiliar no diagnóstico histopatológico de biópsias e aumentar a sua precisão, são utilizados marcadores celulares de oncogenicidade para identificação de lesões de alto grau no colo uterino. O p16 é o único marcador de oncogenicidade oficialmente validado pelo Consenso LAST para, entre outras funções, diferenciar uma amostra histopatológica em benigna ou maligna quando o resultado é NIC 2 por indicar transformação relacionada ao HPV-HR, uma vez que a sua superexpressão está relacionada à inativação da função supressora de tumor da Rb pela oncoproteína E7 do HPV-HR. Porém há limitação no uso do p16, pois sua expressão também pode ser observada em células não displásicas, como metaplasia tubária, células endometriais e colunares normais do colo do útero, por isso, novos marcadores de oncogenicidade estão sendo pesquisados. Um deles, que já tem sido utilizado, é o Ki67, um antígeno nuclear e marcador de proliferação celular (Aizawa *et al.*, 2012; Darragh *et al.*, 2013; Hariri; Øster, 2007; Klaes *et al.*, 2002; Martin; O'leary, 2011; Silva *et al.*, 2017; Waxman *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2016).

Estudamos a sensibilidade, especificidade e acurácia de cada um dos marcadores para avaliar se eles seriam úteis para o diagnóstico das lesões de alto grau dentre aquelas com resultado NIC 2 nas biópsias de lesões do colo do útero. Nossos resultados mostraram que a geminina tem alta sensibilidade, superior à do p16 e estatisticamente igual à do Ki67; já a especificidade da geminina foi baixa, inferior à do p16 e à do Ki67. O único estudo que avaliou a geminina com essa mesma finalidade apresentou um resultado semelhante em relação à sensibilidade desse marcador, porém com a especificidade mais alta. Nesse estudo, a especificidade do p16 e Ki67 foram mais baixas do que no nosso estudo, e as sensibilidades do p16 e do Ki67 foram mais altas (Xing; Wang; Wu, 2017).

Uma razão para essa discrepância em nosso estudo pode ser porque a geminina é um marcador de proliferação celular, expressa em células proliferativas normais, como o epitélio escamoso cervical, sendo esperado ter alta sensibilidade, com comportamento semelhante ao do Ki67 e diferente do p16, que está ligado diretamente ao ciclo celular do HR-HPV – vírus essencial para o desenvolvimento das lesões de alto grau do colo uterino. Isso justificaria a coloração da geminina tanto em células normais quanto em células com lesões de alto grau (Sundara Rajan *et al.*, 2014).

Para aumentar a objetividade, posto que não há validação na literatura para o ponto de corte do Ki67 e da geminina, avaliamos quais camadas do epitélio escamoso do colo do útero foram coradas para cada peça e por cada um dos marcadores. Por meio dessa avaliação, como sugerido por Mitra *et al.* (2016), se houve coloração somente no terço inferior do epitélio, ou seja, camadas basal e parabasal, a lesão seria equivalente à NIC 1; se a coloração chegou até o terço médio do epitélio, NIC 2; e quando atingiu o terço superior do epitélio, NIC 3. Assim como acontece na progressão da lesão pelo HPV-HR, que inicia a sua infecção pelo terço inferior do epitélio escamoso do colo do útero. Após essa análise, comparamos com o resultado histopatológico das peças do procedimento excisional e observamos que o padrão de imunomarcção dos três marcadores teve relação com as categorias diagnósticas de NIC realizadas na análise histopatológica (Mitra *et al.*, 2016).

O resultado dessa análise demonstrou que os três marcadores coraram pelo menos o terço inferior e médio nas lesões que foram classificadas como de alto grau após a cirurgia excisional (NIC 2 ou mais), sendo estatisticamente significativo para o p16. Somente dois casos que coraram até a camada intermediária para os três marcadores tiveram NIC 1 como resultado histopatológico, provavelmente porque na biópsia a lesão foi completamente eliminada. Dos quatro casos que o p16 corou somente o terço inferior do epitélio e que o resultado histopatológico veio de alto grau, dois foram identificados como alto grau pelo Ki67 e um foi identificado como alto grau pela geminina, demonstrando a complementaridade desses marcadores.

A partir desses dados, calculamos novamente a sensibilidade e especificidade dos marcadores para identificação de lesões de alto grau de acordo com a sua coloração em camadas e comparamos os valores dois a dois. As sensibilidades e especificidades foram consideradas estatisticamente iguais para os três marcadores. Até onde sabemos, esse foi o primeiro estudo que avaliou os marcadores a partir da classificação de positividade em camadas do epitélio escamoso estratificado do colo do útero.

Como o p16 – atualmente único marcador validado para a identificação de lesões de alto grau do colo do útero – não é expresso apenas em células displásicas, a associação dele com outros marcadores pode auxiliar nesses desafios diagnósticos. Em células normais, por exemplo, a expressão de p16 e Ki67 é mutuamente exclusiva. Portanto, a detecção simultânea da superexpressão de p16 e Ki67 seria indicativa de

desregulamentação do ciclo celular e uma infecção transformadora por HPV que pode progredir para um câncer de colo do útero (Yu *et al.*, 2016).

Dessa forma, essa combinação de testes diagnósticos aumenta os seus desempenhos de forma individual, por serem complementares na sensibilidade e especificidade, situação que ocorreu no nosso estudo ao calcularmos a sensibilidade e especificidade geral dos marcadores. A sensibilidade do p16, que foi baixa, acabou sendo complementada pela sensibilidade da geminina e do Ki67. Por isso, no caso da identificação de lesões pré-cancerosas do colo do útero, estudos têm mostrado a importância da coloração dupla p16/Ki67 na triagem e no rastreamento dessas lesões, aprimorando os métodos de rastreio atuais (Ikenberg *et al.*, 2013; Melo; Utagawa, 2021; Shomori *et al.*, 2010; Tökés *et al.*, 2015; Walts; Bose, 2009; Yagi *et al.*, 2016).

Nesse sentido, Ikenberg *et al.* (2013) estudaram o uso da coloração dupla na citologia de rastreamento e o resultado foi que a coloração dupla p16/Ki67 foi mais sensível do que a citologia oncológica (86,7% vs 68,5%; $P < 0,01$) para detectar NIC 2 ou mais e com especificidade comparável (95,2% vs 95,4%; $P < 0,01$). Mais uma vez, demonstrando a importância da coloração dupla tanto para triagem quanto para diagnóstico de lesões de alto grau (Ikenberg *et al.*, 2013).

Por essa complementação, correntemente, o p16 e o Ki67 têm sido utilizados de forma conjunta para identificar infecções persistentes por HPV-HR e possíveis lesões precursoras que sejam potencialmente agressivas por terem maior chance de evolução para lesões invasivas.

Para verificarmos essa complementação diagnóstica dos testes, em nosso estudo, combinamos as suas sensibilidades e especificidades de forma pareada para decidir quais pareamentos poderiam ser eficazes para melhorar nossa precisão diagnóstica. Houve aumento tanto da sensibilidade quanto da especificidade quando combinamos os três marcadores ou quando combinamos o p16 com o Ki67 ou com a geminina para diagnosticar a NIC 2 de alto grau, resultado semelhante ao do estudo de Yu *et al.* (2016), em que a sensibilidade da combinação p16/Ki67 foi de 74,9%-90,9% e a especificidade de 72,1%-95,2%.

Assim como a coexpressão do p16 com o Ki67 sugere uma desregulação do ciclo celular mediada pela infecção por HPV-HR e prevê a presença de lesões epiteliais cervicais de alto grau, a coexpressão do p16 com a geminina também pode prever essas lesões de alto grau dentre as NIC 2. Logo, podemos utilizar a geminina em conjunto com o p16 no lugar do Ki67 como um bom marcador de proliferação

celular para identificar lesões de alto grau, ajudando a escolher casos em que a morfologia histopatológica gera dúvidas (Yu *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, a geminina apresentou o mesmo padrão de positividade na marcação imuno-histoquímica independentemente da idade das mulheres com lesão no colo do útero. Esse resultado reforça que a geminina pode ser um bom marcador para auxiliar no diagnóstico histopatológico na diferenciação entre lesões de baixo e alto grau, independentemente da idade da paciente ao diagnóstico, garantindo um melhor acompanhamento (cirúrgico ou expectante), com menor risco de sobretratamento – inclusive em pacientes jovens que têm mais chance de se beneficiar do acompanhamento expectante em vez do tratamento cirúrgico, porque muitas vezes ainda não têm prole definida.

O risco de tratamento cirúrgico desnecessário acontece porque o diagnóstico de lesões precursoras do câncer do colo do útero ocorre, na maioria das vezes, em mulheres sem prole definida. Nesses casos, identificar se a lesão é de alto grau, situação que necessita tratamento cirúrgico, ou de baixo grau, garantindo a possibilidade de acompanhamento, traz a vantagem de evitar desfechos obstétricos negativos e desnecessários no caso do segundo grupo de pacientes. De acordo com a revisão sistemática e metanálise de Arbyn *et al.* (2008), o risco de mortalidade perinatal aumenta significativamente em mulheres tratadas por excisão da zona de transformação, o risco de parto prematuro grave (gestação <32/34 semanas) também foi significativamente mais comum após conização com bisturi a frio; e o estudo mostrou um aumento significativo para baixo peso ao nascer (< 1500 g) e peso extremamente baixo ao nascer (< 1000 g). Esses resultados têm impacto considerável não somente para as mães e bebês envolvidos, mas também no orçamento de saúde para cuidados intensivos neonatais. A metanálise conclui que todos os procedimentos excisionais usados para tratar NIC aumentam o risco de resultados adversos graves na gravidez e sugere que devem ser desenvolvidos procedimentos de triagem e diagnóstico ideais que selecionem apenas os casos em evolução que necessitam de tratamento agressivo, que é o caso do uso dos marcadores p16/geminina, testados em nosso estudo (Arbyn *et al.*, 2008).

Esses desfechos obstétricos ruins ocorrem porque a remoção ou destruição de parte do colo do útero pode comprometer sua função de sustentação, levando à falta de suporte mecânico em uma futura gestação e subsequentemente ruptura

prematura de membranas ovulares e parto prematuro, sendo maior o risco quanto maior a profundidade da excisão de tecido (Arbyn *et al.*, 2008).

Como limitações do estudo, podemos citar o tamanho da amostra relativamente pequeno. Apesar de inicialmente ter sido recrutada uma amostra maior (n=229) do que a definida na estimativa (n=222), o número de pacientes foi reduzido por prontuário incompleto, extravio de lâminas e exclusão após conferência do segundo e terceiro patologistas, resultando em uma amostra de 107 pacientes no grupo caso. Dessa forma, tivemos uma perda de 53% da nossa coorte inicial, o que pode ter gerado um viés de atrito, que poderia ser resolvido com uma amostra maior.

Outro ponto é a natureza retrospectiva do estudo, que pode ter gerado um viés de seleção. Por isso, um estudo prospectivo seria necessário para confirmar as nossas descobertas. Além disso, sem o estudo prospectivo, não conseguimos avaliar o risco de câncer de colo do útero a longo prazo.

Outra limitação deste estudo é que não foi avaliada a expressão da geminina nos carcinomas cervicais. Por isso, os resultados sugerem que a geminina pode servir como biomarcador diagnóstico para identificar lesões de alto grau dentre aquelas com resultado histopatológico NIC 2 e NIC 2/3, entretanto, não temos conhecimento sobre seu uso clínico como variável prognóstica em carcinomas do colo do útero.

O ponto de corte da expressão de geminina utilizado em nosso estudo (>20%) precisa ser validado com outras amostras de biópsias do colo uterino. No entanto, reduzimos esse viés ao utilizarmos uma outra forma de classificação de positividade a partir da coloração dos marcadores em camadas do epitélio do colo do útero.

São necessários mais estudos para investigar o papel da geminina na patogênese e progressão da NIC.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo concluem que a geminina tem alta sensibilidade e baixa especificidade para diferenciar as lesões potencialmente regressivas das potencialmente invasivas nas pacientes com diagnóstico histopatológico de NIC 2 ou NIC 2/3. Porém, ao analisarmos a sua sensibilidade e especificidade para classificação das células pela sua coloração em camadas, percebemos uma maior especificidade e menor sensibilidade.

A sua comparação com os marcadores p16 e Ki67 demonstrou que o p16 tem menor sensibilidade e maior especificidade e o Ki67 tem sensibilidade estatisticamente igual e maior especificidade do que a geminina. Porém, quando avaliamos a partir da coloração em camadas, percebemos que a sensibilidade e especificidade são estatisticamente iguais.

Não houve variação na positividade da geminina para a diferenciação entre lesões de baixo e alto grau do colo do útero em mulheres menores ou maiores de 25 anos.

Assim, a geminina pode ser utilizada como marcador adicional potencial para auxiliar no diagnóstico histopatológico de NIC 2 ou NIC 2/3 sendo combinada ao p16, podendo substituir o Ki67 com a vantagem de já ser utilizada com essa finalidade para outros tecidos o que poderia facilitar sua maior disponibilidade dependendo do serviço estudado.

REFERÊNCIAS

- AGUAYO, F. *et al.* High-risk human Papillomavirus and tobacco smoke interactions in epithelial carcinogenesis. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 2201, 2020.
- AIZAWA, M. *et al.* Geminin expression in pancreatic neuroendocrine tumors: possible new marker of malignancy. **Pancreas**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 512-517, 2012.
- ARBYN, M. *et al.* Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. **BMJ**, London, v. 337, n. sep18 1, p. a1284-a1284, 2008.
- ASLANI, F. S. *et al.* Evaluation of Ki67, p16 and CK17 markers in differentiating cervical intraepithelial neoplasia and benign lesions. **Iranian Journal of Medical Sciences**, Mashhad, v. 38, n. 1, p. 15-21, 2013.
- CALIL, L. N. *et al.* P16INK4a and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. **Pathology Research and Practice**, [s. l.], v. 210, n. 8, p. 482-487, 2014.
- CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: cofactors in human Papillomavirus carcinogenesis: role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute: Monographs**, New York, v. 2003, n. 31, p. 20-28, 2003.
- CHAMPERIS TSANIRAS, S. *et al.* Geminin ablation in vivo enhances tumorigenesis through increased genomic instability: geminin ablation in vivo enhances tumorigenesis. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 246, n. 2, p. 134-140, 2018.
- CHIA, K. V.; FAYLE, R. J. S.; SOBOWALE, O. A. Efficacy of large loop excision of the transformation zone for cervical intraepithelial neoplasia. **The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 287-289, 1993.
- 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 and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 136, n. 10, p. 1266-1297, 2013.
- DEPAMPHILIS, M. L. Spotlight on geminin. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 13, n. 3, 2011.
- DI BONITO, M. *et al.* Overexpression of cell cycle progression inhibitor geminin is associated with tumor stem-like phenotype of triple-negative breast cancer. **Journal of Breast Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 162-171, 2012.
- FARAJI, F. *et al.* Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 19, n. 9-10, p. 464-475, 2017.

GALGANO, M. T. *et al.* Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. **The American Journal of Surgical Pathology**, Philadelphia, v. 34, n. 8, p. 1077-1087, 2010.

GONZALEZ, M. A. *et al.* Geminin predicts adverse clinical outcome in breast cancer by reflecting cell-cycle progression. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 204, n. 2, p. 121-130, 2004.

HARIRI, J.; ØSTER, A. The negative predictive value of p16INK4a to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. **International Journal of Gynecological Pathology**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 223-228, 2007.

HARUKI, T. *et al.* Geminin expression in small lung adenocarcinomas: implication of prognostic significance. **Lung Cancer**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 356-362, 2011.

HULKA, B. S. ASPO Distinguished Achievement Award Lecture. Epidemiological studies using biological markers: issues for epidemiologists. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 13-19, 1991.

IKENBERG, H. *et al.* Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. **Journal of the National Cancer Institute**, New York, v. 105, n. 20, p. 1550-1557, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Detecção precoce do câncer**. Rio de Janeiro: Inca, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//deteccao-precoce-do-cancer.pdf>. Acesso em: 29 set. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: Inca, 2016.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 118, n. 6, p. 1481-1495, 2006.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. **Lancet**, London, v. 370, n. 9599, p. 1609-1621, 2007.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 1060-1069, 2009.

KINGSBURY, S. R. *et al.* Repression of DNA replication licensing in quiescence is independent of geminin and may define the cell cycle state of progenitor cells. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 309, n. 1, p. 56-67, 2005.

KLAES, R. *et al.* p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. **The American Journal of Surgical Pathology**, Philadelphia, v. 26, n. 11, p. 1389-1399, 2002.

KRISTENSEN, J.; LANGHOFF-ROOS, J.; KRISTENSEN, F. B. Increased risk of preterm birth in women with cervical conization. **Obstetrics & Gynecology**, [s. l.], v. 81, n. 6, p. 1005-1008, 1993.

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

LYCKE, K. D. *et al.* Untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and subsequent risk of cervical cancer: population based cohort study. **BMJ**, London, v. 383, p. e075925, 2023.

MARTIN, C. M. *et al.* Gene expression profiling in cervical cancer: identification of novel markers for disease diagnosis and therapy. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 511, p. 333-359, 2009.

MARTIN, C. M.; O'LEARY, J. J. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 605-615, 2011.

MELO, C. A. M.; UTAGAWA, M. L. Expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores p16 e Ki-67 na lesão intraepitelial cervical de alto grau: revisão de estudos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 228-231, 2021.

MITRA, A. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia: screening and management. **British Journal of Hospital Medicine**, London, v. 77, n. 8, p. C118-C123, 2016.

MONTANARI, M. *et al.* Increased expression of geminin stimulates the growth of mammary epithelial cells and is a frequent event in human tumors. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 202, n. 1, p. 215-222, 2005.

NANKIVELL, P.; MEHANNA, H. Oral dysplasia: biomarkers, treatment, and follow-up. **Current Oncology Reports**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 145-152, 2011.

NISHIHARA, K. *et al.* Immunohistochemical expression of geminin in colorectal cancer: implication of prognostic significance. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 1189-1195, 2009.

PATMANIDI, A. L. *et al.* Concise review: geminin – a tale of two tails: DNA replication and transcriptional/epigenetic regulation in stem cells. **Stem Cells**, Dayton, v. 35, n. 2, p. 299-310, 2017.

RICHART, R. M. Cervical intraepithelial neoplasia. **Pathology Annual**, [s. l.], v. 8, p. 301-328, 1973.

ROLDÁN-NOFUENTES, J. A. Compbdt: an R program to compare two binary diagnostic tests subject to a paired design. **BMC Medical Research Methodology**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2020.

SANKAR, S. *et al.* Geminin deficiency enhances survival in a murine medulloblastoma model by inducing apoptosis of preneoplastic granule neuron precursors. **Genes & Cancer**, [s. l.], v. 8, n. 9-10, p. 725-744, 2017.

SANO, D.; ORIDATE, N. The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 819-826, 2016.

SASAKI, T. *et al.* Evidence for a mammalian late-G1 phase inhibitor of replication licensing distinct from geminin or Cdk activity. **Nucleus**, Austin, v. 2, n. 5, p. 455-464, 2011.

SASIENI, P.; CASTANON, A.; CUZICK, J. Effectiveness of cervical screening with age: population based case-control study of prospectively recorded data. **BMJ**, London, v. 339, n. jul28 2, p. b2968-b2968, 2009.

SCHMAUZ, R. *et al.* Multiple infections in cases of cervical cancer from a high-incidence area in tropical Africa. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 805-809, 1989.

SHOMORI, K. *et al.* Geminin, Ki67, and minichromosome maintenance 2 in gastric hyperplastic polyps, adenomas, and intestinal-type carcinomas: pathobiological significance. **Gastric Cancer**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 177-185, ago. 2010.

SHRESTHA, P. *et al.* Geminin: a good prognostic factor in high-grade astrocytic brain tumors. **Cancer**, [s. l.], v. 109, n. 5, p. 949-956, 2007.

SILVA, D. C. *et al.* Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions: a systematic review. **Pathology, Research and Practice**, [s. l.], v. 213, n. 7, p. 723-729, 2017.

SIRIL, Y. J. *et al.* Immunohistochemical assessment of chromatin licensing and DNA replication factor 1, geminin, and γ -H2A.X in oral epithelial precursor lesions and squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 888-896, 2019.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 463-466, 2010.

SUCHYTA, M.; MIOTTO, B.; MCGARRY, T. An inactive geminin mutant that binds Cdt1. **Genes**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 252-266, 2015.

SUNDARA RAJAN, S. *et al.* The potential utility of geminin as a predictive biomarker in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 143, n. 1, p. 91-98, 2014.

TACHIBANA, K.-E. K.; GONZALEZ, M. A.; COLEMAN, N. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 205, n. 2, p. 123-129, 2005.

TAINIO, K. *et al.* Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, London, v. 360, p. k499, 2018.

TILAKI, K. H. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. **Journal of Biomedical Informatics**, [s. l.], v. 48, p. 193-204, 2014.

TÖKÉS, A.-M. *et al.* Expression of proliferation markers Ki67, cyclin A, geminin and aurora-kinase A in primary breast carcinomas and corresponding distant metastases. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 68, n. 4, p. 274-282, 2015.

WALTS, A. E.; BOSE, S. p16, Ki-67, and BD ProExTMC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. **Human Pathology**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 957-964, 2009.

WAXMAN, A. G. *et al.* Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. **Obstetrics and Gynecology**, Washington, D.C., v. 120, n. 6, p. 1465-1471, 2012.

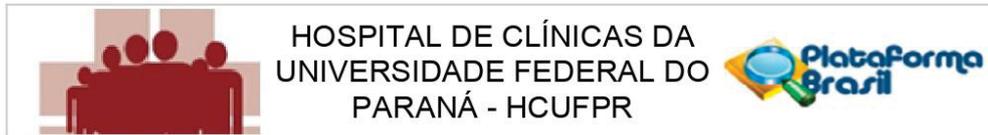
WOHLSCHLEGEL, J. A. *et al.* Expression of geminin as a marker of cell proliferation in normal tissues and malignancies. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 161, n. 1, p. 267-273, 2002.

XING, Y.; WANG, C.; WU, J. Expression of geminin, p16, and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues. **Medicine**, Philadelphia, v. 96, n. 26, 1 jun. 2017.

YAGI, T. *et al.* Prognostic significance of geminin expression levels in Ki67-high subset of estrogen receptor-positive and HER2-negative breast cancers. **Breast Cancer**, Tokyo, v. 23, n. 2, p. 224-230, 2016.

YU, L.-L. *et al.* Evaluation of p16/Ki-67 dual staining in detection of cervical precancer and cancers: a multicenter study in China. **Oncotarget**, New York, v. 7, n. 16, p. 21181-1189, 2016.

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Utilidade da Geminina como Biomarcador para Identificação de Lesões de Alto Grau em Biópsias de Colo Uterino NIC 2 ou NIC 2/3

Pesquisador: Rita Maira Zanine

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 57779722.0.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 7.518.586

Apresentação do Projeto:

Estudo retrospectivo, observacional do tipo caso-controle. O estudo vai consistir na avaliação de prontuários e biópsias de pacientes em acompanhamento no ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia do Complexo Hospital de Clínicas da UFPR.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Os marcadores tumorais geminina, p16 e ki67 são preditores de lesão de alto grau de colo do útero? A geminina é um biomarcador mais sensível e específico do que os atuais marcadores mais utilizados para a diferenciação entre lesão de baixo e alto grau do colo do útero? A geminina é financeiramente mais acessível para amplo uso do que os atuais marcadores?

Objetivo Primário:

O objetivo do trabalho é avaliar a sensibilidade e a especificidade da geminina na diferenciação entre lesões de baixo e alto grau em pacientes com diagnóstico de NIC tipo 2 ou tipo 2/3.

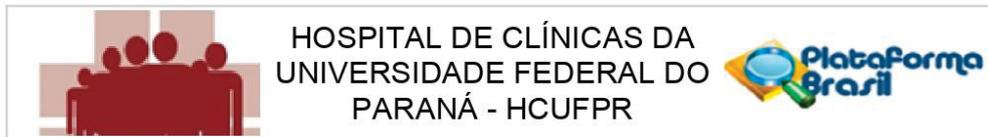
Objetivo Secundário:

3.2.1 Comparar a sensibilidade e especificidade da geminina com os marcadores p16 e Ki67 para a diferenciação entre lesões de baixo e alto grau do colo do útero;

3.2.2 Avaliar se há variação na positividade da geminina para a diferenciação entre lesões de baixo e alto grau do colo do útero para faixas etárias específicas (< ou > de 25 anos);

3.2.3 Avaliar se a geminina pode ser utilizada como marcador adicional, para auxiliar no

Endereço: Rua Gal. Carneiro, nº181, Anexo G, 4º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 7.518.586

diagnóstico histopatológico de NIC 2 ou NIC 2/3

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O principal risco relacionado ao nosso estudo, que será retrospectivo e observacional com análise de peças armazenadas no Serviços de Patologia, será a perda de confidencialidade e extravio de dados e documentos. Porém, com pequena possibilidade de ocorrência porque em nenhum momento as peças ou os prontuários das pacientes serão retirados dos seus locais de origem e os dados ficarão em posse somente dos pesquisadores, sem qualquer tipo de divulgação dos mesmos.

Como o trabalho será retrospectivo, sem contato direto com as pacientes, muitas delas que já não estão em seguimento conosco e outras que foram a óbito, não haverá aplicação de TCLE, pois não haverá qualquer possibilidade de mudança de conduta com as participantes uma vez que elas já foram submetidas ao tratamento cirúrgico, peça essa que será utilizada para avaliar o grau de previsão de lesão dos marcadores tumorais.

Benefícios:

O estudo irá avaliar se a geminina pode ser mais uma ferramenta para auxílio na diferenciação entre lesão de baixo e alto grau do colo do útero, contribuindo para decisão terapêutica, por exemplo, de pacientes sem prole definida, que irão se beneficiar caso não necessitem realizar tratamento excisional com encurtamento do colo uterino e aumento da chance de futuras intercorrências obstétricas como ruptura prematura de membranas

ovulares e parto prematuro.

O principal benefício para a sociedade, portanto, será ampliar a possibilidade de previsão de lesões de alto grau em pacientes que potencialmente sejam prejudicadas ao serem submetidas a exérese de lesões.

As pacientes que serão estudadas e terão as suas biópsias analisadas e dados de prontuário levantados poderão se beneficiar desse estudo se futuramente apresentarem recidiva da lesão auxiliando na decisão terapêutica.

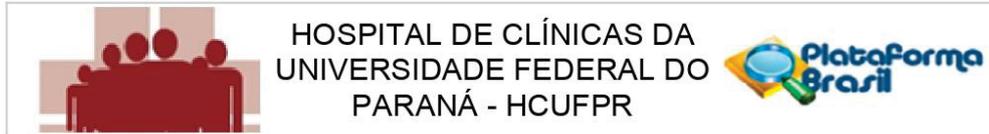
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

CAAE N°57779722.0.0000.0096

TÍTULO DA PESQUISA: Papel da geminina como biomarcador prognóstico em biópsias de colo uterino NIC 2 ou NIC 2/3

PESQUISADOR PRINCIPAL: Rita Maira Zanine

Endereço: Rua Gal. Carneiro, nº181, Anexo G, 4º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 7.518.586

¿TIPO DOCUMENTO (ALTERAÇÃO NO MÉTODO, PESQUISADORES (EQUIPE), CRONOGRAMA, OBJETIVOS, INCLUSÃO DE CASUÍSTICA etc.): Alteração de título

¿ITENS A SEREM CONTEMPLADOS:

1-QUAL A JUSTIFICATIVA PARA EMISSÃO DESTES DOCUMENTOS: Necessidade de troca de título após apresentação final da dissertação por sugestão da banca examinadora para que o título seja igual ao Termo de Aprovação.

2-O QUE PROPÕE O DOCUMENTO APRESENTADO: Trocar o título para ¿Utilidade da Geminina como Biomarcador para Identificação de Lesões de Alto Grau em Biópsias de Colo Uterino NIC 2 ou NIC 2/3¿

3-QUAL A OPINIÃO E POSICIONAMENTO DO PESQUISADOR PRINCIPAL EM RELAÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA, FRENTE AO DOCUMENTO APRESENTADO: Concorda e aceita

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados

Recomendações:

Reitera-se que, apesar da Lei no. 14.874/24 ter entrado em vigor na data de 27/08/2024, o decreto que regulamenta o assunto ainda não foi publicado. Portanto, solicita-se o comprometimento do pesquisador com as regras atualmente vigentes, qual seja a Resolução CNS nº 466, de 2012.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

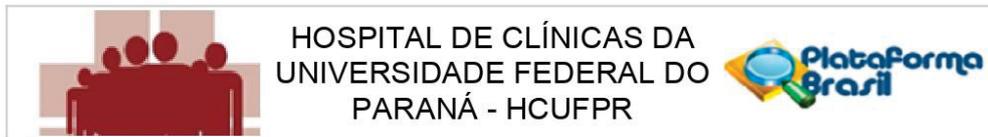
Presente emenda aprovada sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivados.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, nº181, Anexo G, 4º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



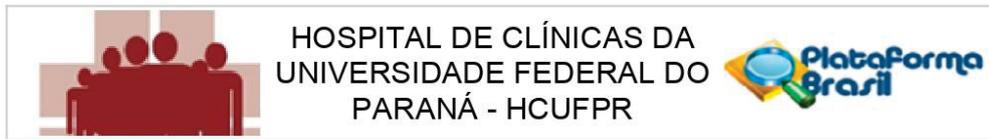
Continuação do Parecer: 7.518.586

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2520047_E2.pdf	07/04/2025 12:25:43		Aceito
Outros	cartadejustificativadeemenda07042025word.doc	07/04/2025 12:25:01	ALINE VIANNA DA COSTA KATZER	Aceito
Outros	cartadejustificativadeemenda07042025.pdf	07/04/2025 12:23:09	ALINE VIANNA DA COSTA KATZER	Aceito
Cronograma	cronogramaprojeto07042025.pdf	07/04/2025 12:21:47	ALINE VIANNA DA COSTA KATZER	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodepesquisacomcronogramaatualizado07042025.docx	07/04/2025 12:19:05	ALINE VIANNA DA COSTA KATZER	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinadafinal07042025.pdf	07/04/2025 12:17:51	ALINE VIANNA DA COSTA KATZER	Aceito
Outros	EMENDAtrocadetitulo17032025assinado.pdf	18/03/2025 23:20:00	ALINE VIANNA DA COSTA KATZER	Aceito
Outros	EMENDAtrocadetituloobjetivo.doc	21/11/2024 21:23:22	ALINE VIANNA DA COSTA KATZER	Aceito
Outros	RELATORIO_PARCIAL.pdf	19/01/2024 10:20:48	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	Lista_de_Conferencia.pdf	11/04/2022 22:52:08	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	ETICA.pdf	11/04/2022 22:50:58	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	APROVACAO_PROJETOS_DE_PESQUISA.pdf	11/04/2022 22:50:05	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	ANALISE_MERITO.pdf	11/04/2022 22:48:53	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	QUALIFICAO_PESQUISADORES_LATTES.pdf	11/04/2022 22:47:13	Rita Maira Zanine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_TERMO_CONSENTIMENTO.pdf	11/04/2022 22:45:34	Rita Maira Zanine	Aceito
Orçamento	DECLARAO_AUSNCIA_CUSTOS_CHC.pdf	11/04/2022 22:40:41	Rita Maira Zanine	Aceito

Endereço: Rua Gal. Carneiro, nº181, Anexo G, 4º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 7.518.586

Declaração de Pesquisadores	DECLARACOES_COMPROMISSO_EQ UIPE_PESQUISA.pdf	11/04/2022 22:39:43	Rita Maira Zanine	Aceito
Declaração de concordância	CONCORDANCIA_DAS_UNIDADES_ENVOLVIDAS.pdf	11/04/2022 22:36:54	Rita Maira Zanine	Aceito
Outros	DECLARACAO_ORIENTADOR_DO_PROJETO.pdf	11/04/2022 22:35:27	Rita Maira Zanine	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	CARTA_ENCAMINHAMENTO_PESQUISADOR_AO_CEP.pdf	11/04/2022 22:26:58	Rita Maira Zanine	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 22 de Abril de 2025

Assinado por:
Niazy Ramos Filho
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Gal. Carneiro, nº181, Anexo G, 4º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br