

**RENATA DE MARCHI TRIGLIA**

**ASPECTOS PREDITIVOS DA PROGRESSÃO DA LESÃO  
DE NIC 1 EM BIÓPSIAS DO COLO UTERINO:  
estudo comparativo entre o método da hibridização  
*in situ* e a expressão do Ki67, avaliada por  
métodos morfológicos quantitativos**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2010**

**RENATA DE MARCHI TRIGLIA**

**ASPECTOS PREDITIVOS DA PROGRESSÃO DA LESÃO  
DE NIC 1 EM BIÓPSIAS DO COLO UTERINO:  
estudo comparativo entre o método da hibridização  
*in situ* e a expressão do Ki67, avaliada por  
métodos morfológicos quantitativos**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de  
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração de  
Anatomia Patológica

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. LILIANA AP. LUCCI DE ANGELO ANDRADE**

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. KONRADIN METZE**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

T734a      Triglia, Renata de Marchi  
Aspectos preditivos da progressão da lesão de NIC 1 em  
biópsias do colo uterino: estudo comparativo entre o método da  
hibridização *in situ* e a expressão do Ki67, avaliada por métodos  
morfológicos quantitativos / Renata de Marchi Triglia.  
Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade;  
Konradin Metze  
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vírus do papiloma. 2. Hibridização *in situ*. 3. Prognóstico.  
4. Displasia do colo uterino. I. Andrade, Liliana Aparecida Lucci  
de Angelo. II. Metze, Konradin. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês: NIC 1 lesion progression in cervical biopsies: predictive value of *in situ* hybridization technique versus Ki67 expression, as evaluated by quantitative morphological methods**

**Keywords:**

- Papillomavirus
- In situ hybridization
- Prognostic
- Uterine cervical dysplasia

**Titulação: Doutor em Ciências Médicas**

**Área de concentração: Anatomia Patológica**

**Banca examinadora:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade**

**Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. João Norberto Stávale**

**Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Gustavo Rubino de Azevedo Focchi**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Rodrigues de Meirelles**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Letícia Cintra**

**Data da defesa: 03-02-2010**

---

## Banca examinadora de Tese de Doutorado

---

Renata De Marchi Triglia

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Lilliana Aparecida Luci De Angelo Andrade**

---



<b>Membros:</b>	
Professor (a) Doutor (a) João Norberto Stavale	
Professor (a) Doutor (a) Gustavo Rubino de Azevedo Focchi	
Professor (a) Doutor (a) Luciana Rodrigues de Meirelles	
Professor (a) Doutor (a) Maria Leticia Cintra	

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 03/02/2010**

---

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais,  
Renato e Elza,  
pelo amor incondicional,  
dedicação e esforço,  
e  
como exemplos de valores humanos.

Ao meu esposo,  
Paulo,  
pelo amor,  
compreensão e apoio,  
sempre presentes em nossa caminhada.

## AGRADECIMENTOS

---

À minha orientadora Profa. Dra. Liliana L. de Angelo Andrade, pelos seus ensinamentos, apoio e confiança, e pela sua sensibilidade que a diferencia como educadora.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Konradin Metze, pelas suas idéias e contribuição teórica, além da inestimável assistência nas análises estatísticas.

Ao Dr. Randall L. Adam, pelo fornecimento do programa por ele criado, de grande valia para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Sirlei S. Moraes, pela sua disponibilidade e imprescindível colaboração nos cálculos estatísticos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em seu auxílio financeiro, essencial à elaboração deste projeto. (processo no 472028/06-5)

A todos os professores do Departamento de Anatomia Patológica, pelo carinho e confiança desde o início da minha jornada patológica...

A toda minha família, em especial às minhas irmãs Gisele e Gislaine, pela amizade e inestimável dedicação que sempre me depositaram em toda a vida...

Às amigas Rita de Cássia P. Martins e Luciana R. Moreira, por todo apoio e paciência, nas horas mais difíceis.

Às funcionárias do Laboratório de Imunoistoquímica, Marisa, Glauce e Priscila, pela importante ajuda na realização das reações imunoistoquímicas.

À Claudia Piazza, pela grandiosa colaboração na reação de hibridização.

Às técnicas Geralda e Luzia, pelo exímio trabalho na confecção das lâminas.

Ao Adilson Piazza, pela valiosa contribuição na documentação das imagens deste trabalho.

Às secretárias Maria do Carmo e Elizabeth, pela paciência e disponibilidade sempre presentes.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da trajetória desta pesquisa.

***“De tudo ficam três coisas:  
a certeza de que estamos sempre a começar,  
a certeza de que é preciso continuar,  
e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.”***

**Fernando Sabino**

As Neoplasias Intra-epiteliais Cervicais (NIC) são precursoras do carcinoma do colo uterino e, em sua maioria, causadas pelos vírus do Papiloma Humano (HPV) de alto risco oncogênico. A maior parte das NIC1 regride, mas cerca de 15% pode progredir e a integração viral ao genoma da célula tem papel importante neste evento. A hibridização *in situ* (HIS) detecta o tipo de vírus na lesão e, tem sido atribuído que o sinal difuso desta reação se relaciona à forma episomal do vírus, enquanto o puntiforme representa o DNA viral integrado ao genoma. O Ki67, marcador de proliferação celular, tem sido usado na graduação das NIC e pode ser um adjuvante na avaliação do comportamento das NIC1.

**Métodos:** 74 biópsias de NIC1 foram estudadas, cujas pacientes apresentaram no acompanhamento biópsias com diagnósticos variados: 19 de cervicite (regressão), 29 com manutenção de NIC1 e 26 com progressão para NIC 2-3. A primeira biópsia foi analisada pela reação de HIS para HPV de alto risco oncogênico (Genpoint®) e pela reação imunoistoquímica para Ki67. Na HIS foram avaliados o número e a distribuição das células nas camadas epiteliais (basal, intermédia ou superficial) e o tipo de sinal (puntiforme ou difuso). A análise do Ki67 foi realizada de 2 formas: **a)** leitura com avaliação subjetiva da expressão em diferentes níveis do epitélio (camadas basal e para-basal, até a metade e mais da metade da espessura epitelial), **b)** análise morfológica quantitativa por um programa de computador (“Sociology”), capaz de fazer muitas medidas, como densidade nuclear e relações de vizinhança entre os núcleos.

**Resultados:** a idade da pacientes variou de 16 a 65 anos, sendo a média diferente entre os grupos com e sem progressão (31 e 26, respectivamente,  $p=0,02$ ). A HIS foi positiva em 22 casos (30%), dos quais 8 progrediram e 14, não. Todos mostraram sinais puntiformes e difusos, entretanto sinal puntiforme na camada basal foi observado em 58,5% dos que progrediram e em apenas 4% dos casos sem progressão ( $p=0,05$ ). A avaliação subjetiva do Ki67 demonstrou que o

grupo que progrediu expressou positividade em mais da metade do epitélio ( $p=0,02$ ). A análise morfológica quantitativa do Ki67 evidenciou os seguintes resultados significativos no grupo com regressão: menor densidade nuclear, menor quantidade de vizinhos e maior distância entre os núcleos vizinhos mais próximos ( $p=0,019$ ;  $0,008$  e  $0,02$ ). As medidas da altura dos núcleos positivos no epitélio e da espessura epitelial não mostraram diferença.

**Conclusão:** o sinal puntiforme da HIS na camada basal, a expressão do Ki67 em mais da metade do epitélio, avaliada subjetivamente, e a maior densidade de núcleos na análise morfológica quantitativa estão mais associados à manutenção e progressão das lesões de NIC1.

**Palavras-chave:** NIC1, HPV, Hibridização *in situ*, Ki67, evolução.

Cervical Intraepithelial Neoplasias (CIN) are precursory lesions of the cervical carcinoma, and most of them are caused by high-risk Human Papillomavirus (HPV). The majority of CIN1 can regress, but around 15% progress, and viral integration has an important role in this event. Integration can be identified by *In situ* hybridization (ISH). Literature has considered a punctate signal in ISH as integrated HPV, and the diffuse signal as episomal virus. Ki67, a marker of cellular proliferation, can be useful in graduating CIN and evaluating CIN1 behavior.

**Methods:** 74 CIN1 cases were studied and all patients had another biopsy in the follow-up which revealed: 19 without CIN (regression), 29 with maintenance of CIN1 diagnosis, and 26 that progressed to CIN2-3. ISH with Genpoint® for high risk HPV was evaluated according to the distribution of positive cells at different levels in squamous epithelium: basal, intermediate or superficial layers. The pattern of ISH reaction was classified as diffuse or punctate. Ki67 analysis was performed by 2 different ways: **a)** interpretation with subjective estimation of the immunostaining in different epithelium levels (basal and parabasal layers, until a half and more than a half of the epithelium thickness); **b)** quantitative morphological analysis by a software (“Sociology”), capable of performing many measurements, as nuclear density and neighborhood relations among the nuclei.

**Results:** the age varied from 16 to 65 and mean age without progression was 26 and 31 for progression ( $p=0.02$ ). ISH was positive in 30% (22 cases: 8 with lesion progression and 14 without). All cases showed punctate and diffuse signals, but punctate were observed in 58.5% with progression and only in 4% without ( $p=0.05$ ). Ki67 subjective analysis revealed that group with progression expressed positive nuclei in more than a half of the epithelium thickness ( $p=0.02$ ). In the regression group, Ki67 quantitative morphological analysis showed smaller nuclei density, a lower quantity of positive cells and a longer distance between neighbor cells when compared to the others ( $p=0,019$ ;  $0,008$  e  $0,02$ ).

The height of Ki67 positive nuclei and the epithelial thickness were not different among the 3 groups.

**Conclusion:** an ISH punctate signal in the basal layer, Ki67 expression in more than a half of epithelium thickness and the nuclear Ki67 density evaluated quantitatively can be related to CIN1 maintenance and progression.

**Key-words:** CIN1, HPV, *In situ* hybridization, Ki67, evolution.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>AMQ:</b>	Análise Morfológica Quantitativa
<b>ASC-US:</b>	Atypical squamous cells of undetermined significance (células escamosas atípicas de significado indeterminado)
<b>ASC-H:</b>	Atypical squamous cells - cannot rule out high grade (células escamosas atípicas que não permitem excluir lesão de alto grau)
<b>AGUS:</b>	Atypical glandular cells of undetermined significance (células glandulares atípicas de significado indeterminado)
<b>CAISM:</b>	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
<b>CDK:</b>	Cyclin-dependent kinase (Quinase ciclina-dependente)
<b>DAB:</b>	Diaminobenzidina
<b>DAP:</b>	Departamento de Anatomia Patológica
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>Fase G0:</b>	“gap” do ciclo celular, em que a célula encontra-se quiescente
<b>Fase G1:</b>	Primeira fase de “gap” do ciclo celular
<b>Fase G2:</b>	Segunda fase de “gap” do ciclo celular
<b>HIS:</b>	Hibridização <i>in situ</i>
<b>HIV:</b>	Human Immunodeficiency Virus (vírus da imunodeficiência humana)
<b>HPV:</b>	Human Papillomavirus

<b>IE:</b>	Índice de Estratificação
<b>M:</b>	Mitose
<b>NIC:</b>	Neoplasia Intra-epitelial Cervical
<b>NIC1:</b>	Neoplasia Intra-epitelial Cervical de grau 1
<b>NIC2:</b>	Neoplasia Intra-epitelial Cervical de grau 2
<b>NIC3:</b>	Neoplasia Intra-epitelial Cervical de grau 3
<b>OMS:</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PCNA:</b>	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
<b>PCR:</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>pRB:</b>	Proteína do Retinoblastoma
<b>TBST:</b>	Tris-buffered saline tween
<b>UNICAMP:</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>VPP:</b>	Valor preditivo positivo
<b>VPN:</b>	Valor preditivo negativo
<b>WHO:</b>	World Health Organization

	Pág.
<b>Tabela 1:</b> Avaliação qualitativa dos padrões de reação da HIS, sua distribuição nas diferentes porções do epitélio e a evolução da lesão.....	83
<b>Tabela 2:</b> Distribuição do número absoluto mínimo e máximo de núcleos positivos, número médio e DP em relação ao padrão do sinal na HIS nas diversas regiões do epitélio...	84
<b>Tabela 3:</b> Número percentual de células nas diferentes porções epiteliais de acordo com o padrão do sinal na HIS e o comportamento da lesão.....	85
<b>Tabela 4:</b> Coeficiente entre o número de núcleos de padrão puntiforme e difuso pela HIS e sua correlação com a evolução da lesão.....	85
<b>Tabela 5:</b> Distribuição da expressão do Ki67 nas diferentes regiões do epitélio nos grupos estudados.....	86
<b>Tabela 6:</b> Distribuição da expressão do Ki67 nas diferentes porções do epitélio e sua relação entre os casos com ou sem progressão da lesão de NIC1.....	87
<b>Tabela 7:</b> Densidade nuclear, número de triângulos formados e de vértices nos 3 grupos.....	88

<b>Tabela 8:</b>	Relação de vizinhança entre os núcleos medida pela distância ao vizinho mais próximo e pela média do número de vizinhos por núcleo.....	89
<b>Tabela 9:</b>	Expressão do Ki67 em diferentes níveis do epitélio e sua relação com a positividade do HPV e a evolução da lesão.....	90
<b>Tabela 10:</b>	Comparação entre a densidade de núcleos positivos para Ki67 e número de vértices do MST em relação à positividade para HPV de alto risco oncogênico pela HIS.....	92
<b>Tabela 11:</b>	Valores da Correlação de Pearson (r) entre o número absoluto de núcleos positivos, o percentual de núcleos com marcação difusa na HIS e a densidade de núcleos/mm <sup>2</sup> , número de triângulos e de vértices formados na triangulação realizada pelo programa “Sociology”, com o Ki67.....	93

	Pág.
<b>Figura 1:</b> NIC 1: hiperplasia da basal, com atipia leve, maturação epitelial preservada, com numerosos coilócitos nas camadas superficiais.....	39
<b>Figura 2:</b> NIC 2: atipia celular marcada e desarranjo arquitetural nos 2/3 profundos do epitélio, maturação presente com coilócitos nas camadas superficiais e figuras de mitose atípicas e altas no epitélio.....	40
<b>Figura 3:</b> NIC 3: atipias e mitoses em todas as camadas do epitélio, que mostra falta de maturação e menor número de coilócitos em relação à NIC2.....	41
<b>Figura 4:</b> Demonstração da MST.....	49
<b>Figura 5:</b> Como desenhar um polígono de Voronoi: seis pontos são representados. Em “a” o polígono de Voronoi do ponto denominado 1, é construído sequencialmente. Uma linha é desenhada, localizada a meia distância entre 1 e 2 e perpendicular à linha entre 1 e 2 é traçada uma mediana. Em “b”, o mesmo é feito. As duas medianas desenhadas terminam em sua intersecção (c) e um terceiro lado é desenhado agora. Em “d” e em “e” o polígono é completado. As linhas desenhadas entre 1 e cada um de seus vizinhos são apagadas, em “f” vemos o polígono de Voronoi. O ponto não fica necessariamente no centro do polígono. Pela definição, há somente um ponto por polígono.....	50

<b>Figura 6:</b>	Diagrama de Voronoi.....	51
<b>Figura 7:</b>	Diagrama de Voronoi (linha tracejada) sobreposto à triangulação de Delaunay (linha cheia).....	52
<b>Figura 8:</b>	Com o cursor são marcados: núcleos Ki67 positivos (“x” preto); negativos (“x” vermelho); membrana basal (linha preta) e topo do epitélio (linha branca).....	72
<b>Figura 9:</b>	Pode-se notar, neste caso, a irregularidade da membrana basal, assim como área em corte tangencial, cuja membrana basal foi também marcada (seta).....	73
<b>Figura 10:</b>	Diagrama de Voronoi gerado pelo programa “Sociology”.....	74
<b>Figura 11:</b>	A triangulação de Delaunay é automaticamente calculada. Podem ser observados: triângulos entre núcleos positivos, entre negativos e constituídos por núcleos positivos e negativos.....	75
<b>Figura 12:</b>	Distribuição dos núcleos nas diversas camadas epiteliais, onde cada cor corresponde a uma camada.....	76
<b>Figura 13:</b>	Padrões da reação de HIS: observam-se núcleos positivos difusos (cabeças de seta) e puntiformes (setas), presentes especialmente nas camadas superficiais do epitélio, porém alguns nas camadas intermédias (setas vermelhas).....	82

	Pág.
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1- INTRODUÇÃO.....	35
1.1- Histórico e Classificação das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC).....	37
1.2- Papel da Infecção pelo HPV e História Natural da NIC.....	41
1.3- Padrões de Expressão do HPV com a técnica da Hibridização <i>in situ</i> .....	44
1.4- Expressão Imunoistoquímica do Ki67 nas NIC.....	47
2- JUSTIFICATIVA.....	55
3- OBJETIVOS.....	59
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.1- Grupos de Estudo.....	65
4.2- Avaliação Histológica.....	65
4.3- Critérios de Exclusão.....	66
4.4- Técnica da Hibridização <i>in situ</i> para HPV.....	66
4.5- Avaliação da reação de Hibridização <i>in situ</i> .....	67

4.6- Reação de Imunoistoquímica para o Ki67.....	69
4.7- Análise da Expressão do marcador Ki67.....	71
4.8- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	78
<b>5- RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
5.1- Hibridização <i>in situ</i> .....	81
5.2- Ki67.....	86
<b>6- DISCUSSÃO.....</b>	<b>95</b>
6.1- Hibridização <i>in situ</i> .....	97
6.2- Expressão do Ki67.....	101
<b>7- CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
7.1- Idade.....	107
7.2- Expressão do HPV de alto risco oncogênico pela técnica da Hibridização <i>in situ</i> nas NIC1.....	107
7.3- Expressão do Ki67 pela simples avaliação da reação.....	108
7.4- Expressão do Ki67 pela análise morfológica quantitativa.....	108
7.5- Comparação dos dados da HIS com a análise do Ki67.....	108
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>
<b>9- ANEXOS.....</b>	<b>121</b>

# 1- INTRODUÇÃO

---

## 1.1- Histórico e classificação das neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC)

As neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) são definidas como um espectro de alterações no epitélio escamoso que ocorrem predominantemente na zona de transformação cervical, causadas por infecções pelo Papiloma vírus Humano (HPV) (1). Seu papel como lesões precursoras do carcinoma epidermóide do colo uterino está muito bem estabelecido (2) e sua existência foi primeiramente reconhecida por Sir John Williams, em 1886 (*apud* 3).

Cullen, em 1900 (*apud* 3), descreveu as características histológicas destas lesões e notou que apresentavam vários aspectos morfológicos semelhantes ao carcinoma invasor. Broders introduziu o termo “carcinoma *in situ*” e Pemberton e Smith (*apud* 3) foram os primeiros a verificar uma relação temporal entre carcinoma *in situ* e o aparecimento de lesões invasoras. Com o passar do tempo, numerosos estudos com longos períodos de acompanhamento foram realizados, consolidando a importância das NIC no desenvolvimento do carcinoma epidermóide cervical (3).

Desde então, diversas terminologias e classificações vêm sendo empregadas. A partir dos estudos sobre ploidia nestas lesões, Richart RM et al, 1973 (*apud* 3), propuseram a terminologia de Neoplasia Intra-epitelial Cervical, classificando-as em NIC1, 2 e 3 (correspondendo, respectivamente, à displasia leve, moderada e grave ou carcinoma *in situ*).

A denominação Neoplasia Intra-epitelial Cervical ou, por outros autores, Neoplasia Escamosa Cervical (do inglês *cervical squamous neoplasia* ou *squamous intraepithelial lesion*), tornou-se universalmente utilizada. Com estudos sobre o comportamento e história natural destas lesões, a partir da década de 90, foi proposto um sistema de classificação binário (sistema de Bethesda), onde tanto as NIC1 quanto os condilomas corresponderiam à lesão intra-epitelial de baixo grau e as NIC2 e 3 às lesões intra-epiteliais de alto grau, sendo utilizado especialmente por citopatologistas. Este sistema binário também separa as neoplasias intra-epiteliais nas quais o vírus encontra-se na sua forma episossomal

ou extra-cromossômica (lesão de baixo grau) daquelas nas quais o vírus encontra-se integrado ao genoma celular (de alto grau). As lesões de baixo grau geralmente são acompanhadas clinicamente, enquanto que as de alto grau devem ser tratadas com conização (4).

As NIC compreendem um espectro de lesões, de acordo com seu grau de comprometimento epitelial e características citológicas, compartilhando entre si etiologia e história natural (5). As alterações morfológicas atualmente utilizadas para a classificação histológica das NIC, que será empregada neste trabalho, seguem o conceito mais recente da Organização Mundial de Saúde (6):

#### 1.1.1- Neoplasia intra-epitelial cervical de Grau 1 (NIC 1)

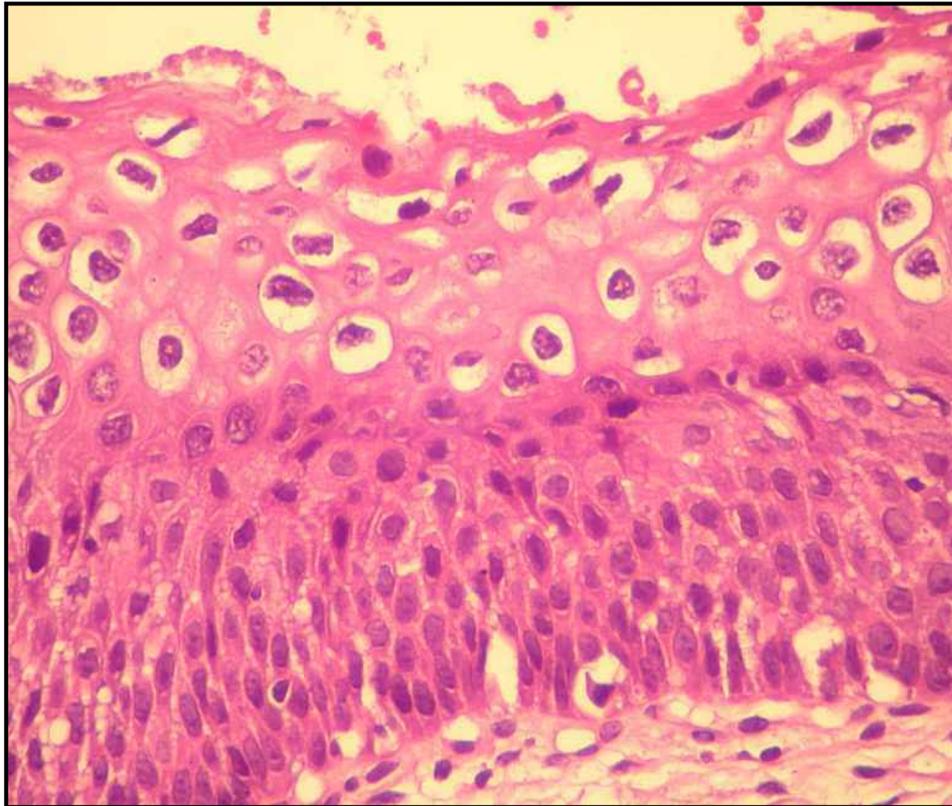
Observa-se, em grau variado, acantose epitelial, hiperplasia da camada basal e para-basal, e maturação epitelial preservada. Nas camadas mais superiores, são verificadas as *atipias coilocitóticas*, caracterizadas por células com núcleos grandes e hipercromáticos, de contornos irregulares, halos claros perinucleares e, por vezes, binucleação. As figuras de mitose se atêm às camadas basais, sendo raras na camada intermediária do epitélio e ausentes nas superiores (Figura 1).

#### 1.1.2- Neoplasia intra-epitelial cervical de Grau 2 (NIC 2)

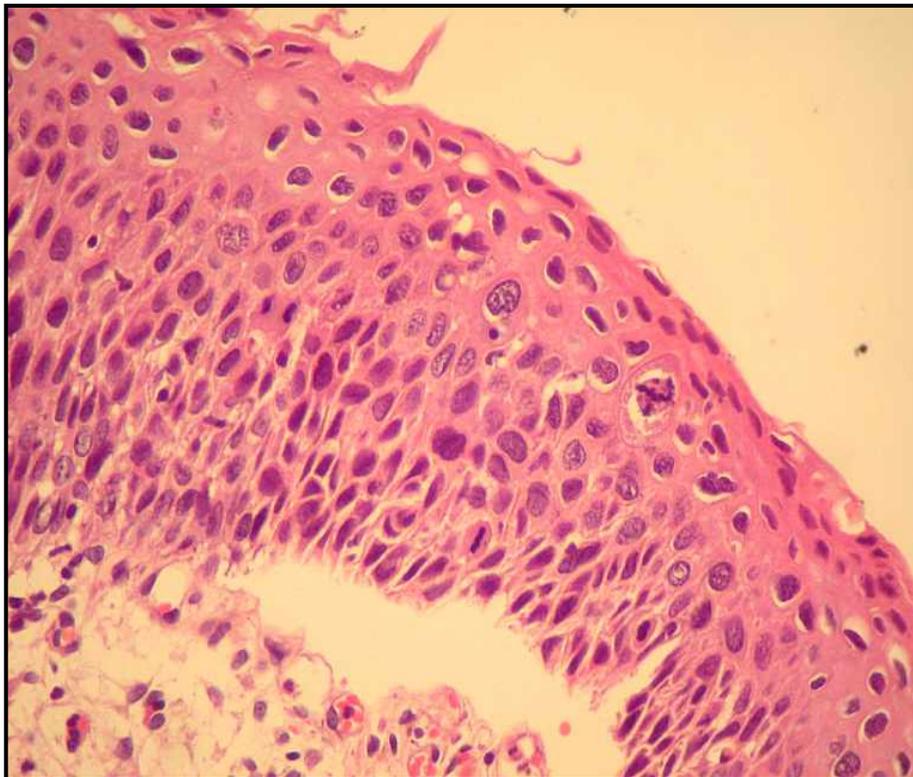
Nota-se maturação ainda preservada, com coilócitos, nas camadas superficiais do epitélio, porém na metade ou 2/3 inferiores do epitélio, as células exibem núcleos basalóides atípicos e hipercromáticos, ora bizarros, com perda da polaridade celular, além de figuras de mitose freqüentes, eventualmente atípicas, não mais restritas à camada basal (Figura 2).

### 1.1.3- Neoplasia intra-epitelial cervical de Grau 3 (NIC 3)

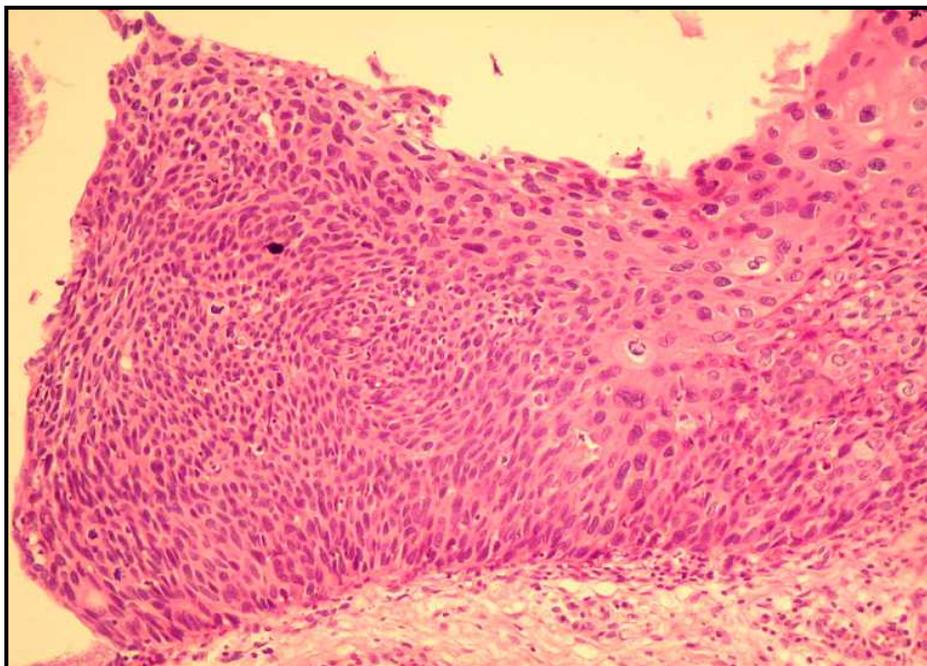
Este diagnóstico é permitido quando as células basalóides e imaturas ocupam praticamente ou toda a espessura epitelial. A maturação epitelial está prejudicada, o que se associa à rara presença de coilócitos. As figuras de mitose são numerosas e presentes em qualquer altura do epitélio (Figura 3).



**Figura 1-** NIC 1: hiperplasia da basal, com atipia leve, maturação epitelial preservada, com numerosos coilócitos nas camadas superficiais.



**Figura 2-** NIC 2: atipia celular marcada e desarranjo arquitetural nos 2/3 profundos do epitélio, maturac o presente com coilócitos nas camadas superficiais e figuras de mitose atípicas e altas no epitélio.



**Figura 3-** NIC 3: atipias e mitoses em todas as camadas do epitélio, que mostra falta de maturação e menor número de coilócitos em relação ao NIC2.

### **1.2- Papel da infecção pelo HPV e história natural da NIC**

O papel do Papilomavírus Humano (HPV) como agente causal no desenvolvimento da neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e carcinoma do colo uterino está bem estabelecido, de acordo com diversos trabalhos da literatura (2).

Mais de 100 tipos de HPV foram isolados, e aproximadamente 40 estão relacionados a várias lesões do trato genital. Os tipos de HPV de baixo risco oncogênico mais frequentes são o HPV 6 e 11, frequentemente associados a lesões benignas, como o condiloma acuminado, mas não com o carcinoma cervical. Os HPV de alto risco mais comumente encontrados são HPV 16 e 18, que podem provocar as NIC e carcinoma do trato genital inferior (7).

A infecção pelo HPV é mais prevalente em mulheres jovens e adolescentes, provavelmente devido à falha de resposta imunológica pela não exposição prévia ao vírus, somando-se ainda fatores biológicos: o processo de metaplasia escamosa na zona de transformação cervical ocorre durante a puberdade, não havendo, assim, elemento “protetor” às células basais epiteliais (8). Por outro lado, o grupo de mulheres mais velhas, na faixa dos 30 a 40 anos, se associa à infecção viral persistente e, por conseguinte, é mais susceptível à progressão da lesão de NIC (9).

A história natural das neoplasias intra-epiteliais cervicais é extremamente variável, e apenas a presença de certo tipo viral não é suficiente para sua progressão, regressão ou persistência (10). Isto é corroborado pelo fato de que alta porcentagem das lesões intra-epiteliais de baixo grau são positivas para HPV de alto risco oncogênico (80%) e, mesmo assim, a maioria regride espontaneamente (11, 12). Por outro lado, as NIC 3 têm 12% de probabilidade de evolução para carcinoma invasor (13).

Os intervalos de tempo adotados na literatura para progressão, persistência da lesão e regressão são muito variados e, em muitos casos, torna-se difícil esta afirmação e a comparação de diferentes trabalhos. Song SH et al, 2006 (14), adotaram como conceito de NIC persistente aqueles casos com acompanhamento por mais de 24 meses, e que apresentavam o mesmo grau de NIC como diagnóstico. Entretanto, outros autores usam outros períodos de seguimento. No estudo de Omori M et al 2007 (15), as pacientes foram acompanhadas por, no mínimo 4 meses (intervalo entre biópsias), enquanto que Nappi L, 2005 (16) seguiu os casos por 36 meses.

O critério de progressão das lesões é mais uniforme entre os autores, adotado quando a paciente passa a apresentar maior grau de neoplasia intra-epitelial cervical, confirmado histologicamente, sendo, contudo, o mais difícil de se estabelecer, visto que, frequentemente, existe um espectro de lesões na mesma paciente. Por outro lado, é consenso entre os autores que, quando se avalia progressão, os diagnósticos devem ser embasados em substratos

histológicos, e os dados citológicos seriam adjuvantes no acompanhamento destas pacientes (14,15).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da neoplasia intra-epitelial de alto grau (NIC2 e 3) mais estudados são: infecção persistente pelo mesmo tipo de HPV (especialmente pelo HPV16); tipo de HPV (18% das pacientes com HPV16 desenvolvem NIC de alto grau); carga viral; *status* viral da lesão (vírus integrado ou na forma epissomal), dentre outros (17).

No colo uterino normal, apenas as células basais e para-basais do epitélio escamoso são capazes de se dividir. Após o ciclo celular, as células supra-basais são então destinadas a um programa ordenado de diferenciação e maturação ao longo do epitélio, sem evidência de divisão celular (12). A divisão celular normal é iniciada com as quinases ciclina-dependentes (CDKs) 4 e 6, que, em complexo com a ciclina D1, levam à fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRB). Esta proteína fosforilada, fica então inativa, causando a liberação da transcrição do fator E2F, um promotor da divisão da célula. Isto promove um aumento da expressão de proteínas supressoras tumorais, inibição das CDKs 4 e 6, impedindo um novo ciclo celular (18).

O vírus infectante entra nas células epiteliais via camada basal do epitélio cervical e leva a alterações histopatológicas que variam conforme o *status* viral na lesão, ou seja, se no estado epissomal ou integrado ao genoma celular. Se estiver na forma epissômica (não integrada), o número de cópias virais aumenta e provoca a alteração morfológica conhecida como atipia colilocitótica, mostrando maturação preservada do epitélio, porém exibindo maior atividade proliferativa, com espessamento da camada basal. Nos casos dos HPV de alto risco, através da ação de seus oncogenes virais nas células basais (“stem cells”), ou seja, células com capacidade de replicação, ocorre uma série de eventos moleculares que desorganizam o ciclo celular normal, aumentam a susceptibilidade ao dano do DNA celular e podem levar a desarranjos cromossômicos (19).

Estas alterações progressivas frequentemente são acompanhadas por integração do vírus ao genoma hospedeiro, um evento crítico à carcinogênese (20). Embora os mecanismos da integração do HPV não sejam totalmente compreendidos, tem-se constatado que este evento seja acidental (12). Para que esta ocorra, é necessário que haja uma quebra no genoma viral, nas regiões E1 e E2. Prossegue-se com a perda de função destes genes, e desregulação da expressão dos genes virais E6 e E7. Suas proteínas E6 e E7 aumentam a degradação dos produtos dos genes supressores tumorais da célula hospedeira, como o p53 ou pRb (proteína do retinoblastoma), levando à transformação e imortalização dos ceratinócitos (10). Vários estudos mostram que a integração do DNA do HPV nas células basais do epitélio escamoso precede a transformação de lesões de baixo grau (NIC 1) para alto grau (NIC 2 e 3), porém é incomum que ocorra a integração em casos de NIC 1, sendo mais freqüentes em NIC 2 e 3. Entretanto, há na literatura, discordância nestes resultados que podem ser devido a problemas técnicos e de interpretação na avaliação da integração por diferentes métodos (21).

Cerca de 15% das NIC 1 irão progredir para NIC 2 ou 3 (12) e tem-se estudado exaustivamente o que provoca este evento, e como poderíamos identificá-lo. Até o momento, os critérios morfológicos não conseguem discernir as lesões que sofrerão regressão daquelas que podem persistir ou progredir (22). Assim, é necessário buscar marcadores que tenham esta capacidade de distinção, fazendo com que as mulheres com lesões com maior risco de progressão para alto grau tenham um seguimento mais controlado e eficiente.

### **1.3- Padrões de expressão do HPV com a técnica de hibridização *in situ*.**

O padrão-ouro para se investigar a integração do HPV ao DNA do hospedeiro é a técnica do PCR, que, entretanto, destrói a arquitetura do tecido.

A Hibridização *in situ* (HIS), por outro lado, mantém a integridade do tecido, detecta o tipo de HPV presente na lesão e, com as melhorias da técnica, vem apresentando boa concordância com os resultados obtidos pela PCR (23, 24, 25). A positividade da reação de hibridização ao HPV tem sido descrita em três padrões diferentes: difuso (positivo em todo o núcleo), puntiforme (também chamado de “dot”), e misto, quando os dois padrões existem na mesma lesão (figura 13). Estudos têm demonstrado que o difuso corresponderia à forma episomal do vírus, enquanto o puntiforme ocorreria quando já houvesse a integração viral ao genoma da célula e o tipo misto, quando há combinação de ambas as formas (26).

A integração do HPV ao DNA celular tem sido considerada um bom marcador para as lesões de alto grau e carcinoma invasor, sendo caracterizada pelo sinal puntiforme (ou em “dot” nuclear) na HIS (4). Evans MF et al, 2002 (26), relatam que 100% das NIC 2 e 3 exibiram padrão puntiforme na camada basal, enquanto este aspecto estava presente em apenas 25% dos casos de NIC 1, a maioria dos quais estava associada à infecção por HPV 16 e 18. Segundo dados da literatura (4), as lesões que exibem o padrão puntiforme na HIS, especialmente na camada basal, podem vir a ter um comportamento mais agressivo. Também foi observado que as lesões de NIC 2 e 3 mostravam expressão puntiforme à HIS para HPV de alto risco, em todas as porções do epitélio e que, 86% das NIC 1 foram positivas, com sinal difuso no terço superior do epitélio, sendo que 13% delas ainda mostraram sinal puntiforme focal em células basais e para-basais. Entretanto, não ficou estabelecida a correlação com integração viral nestes casos (27). Verificou-se integração do HPV16 em lesões de baixo grau, principalmente em pacientes mais velhas (28).

O método da HIS tem a grande vantagem da manutenção da morfologia das lesões, porém também é conhecido pela sua baixa sensibilidade, principalmente referidas nos primeiros estudos da literatura, onde não era utilizado reagente de amplificação (23, 25, 29). Ao comparar diferentes métodos de HIS, Sano T. et al, 1998 (23) verificaram que a amplificação pela tiramida conferiu

maior sensibilidade à técnica. Lizard G et al, 2001 (30), estudaram o método de HIS usando o sistema de amplificação chamado de GenPoint® (DAKO) em culturas de células infectadas pelo HPV, descrevendo que houve aumento da sensibilidade em detectar pequeno número de cópias virais.

Evans MF et al, 2002 (26), observaram que, dentre casos de NIC1, 71% mostraram apenas sinal difuso à HIS, e os demais mostraram sinal puntiforme exclusivamente ou misto (puntiforme e difuso). Dentre estes últimos casos, a maioria estava associada à infecção por HPV de alto risco. O sinal difuso estava presente principalmente nas camadas superficial e intermediária do epitélio, enquanto os núcleos de padrão puntiforme eram raros e nas porções mais superiores. Apenas dois casos de NIC 1 exibiram marcação puntiforme na camada basal. Por outro lado, o sinal puntiforme foi evidente em todos os casos de NIC 2 e 3, parte deles com marcação puntiforme exclusivamente, e outros com padrões puntiforme e difuso, presentes em todas as camadas epiteliais. Assim, o sinal puntiforme estaria mais associado às NIC de alto grau, e a positividade na camada basal nos casos de NIC1 poderia estar correlacionada à progressão. Este mesmo autor, em 2003 (31) e 2004 (32), afirma em seus estudos, que a integração viral está associada com o padrão puntiforme, mas não necessariamente todo sinal puntiforme signifique integração.

Estudo comparativo entre os métodos da HIS com amplificação através do GenPoint® (DAKO) e a PCR, em casos de NIC 1, 2 e 3 verificou uma alta concordância entre os resultados (de cerca de 86%), especialmente nos casos de lesões de alto grau. Os casos de NIC 1 não mostraram integração viral à técnica de PCR, e o sinal foi exclusivamente difuso na HIS, porém, a sensibilidade da HIS foi menor nas NIC1 do que nas lesões de NIC 2 e 3 (25).

Omori M et al, 2007 (15), observaram o comportamento de casos de NIC 2, verificando que entre aqueles com sinal puntiforme exclusivo, 73% progrediram para NIC 3 e nenhum deles regrediu, enquanto que todos os casos com apenas sinal difuso regrediram.

Estes trabalhos apontam que o padrão puntiforme na HIS deve ser analisado como um alerta para que estas lesões sejam seguidas mais rigorosamente, pois podem ter um risco maior de evoluírem para NIC de alto grau e carcinoma (24).

#### **1.4- Expressão imunoistoquímica do Ki67 nas NIC**

O antígeno Ki67 é uma proteína de meia-vida curta expressa durante as fases G1, S, e G2 e M do ciclo celular, mas não na fase G0. Seu clone mais utilizado em imunoistoquímica é o MIB-1, um anticorpo monoclonal, resistente ao uso em materiais parafinados (33). É bem estabelecida sua superioridade em relação ao PCNA (antígeno nuclear de proliferação nuclear) que, além de sofrer influências pela fixação, pode também ser expresso nas células em fase G0 (34).

No epitélio escamoso normal, as células positivas para Ki67 estão confinadas às camadas basal e para-basal, que são aquelas capazes de se dividir, dando origem às células que sofrerão maturação até a superfície epitelial (12). A infecção pelo HPV está associada com o aumento da atividade proliferativa do epitélio (35), sendo o Ki67 expresso em camadas epiteliais mais altas nas NIC (36), devido ao aumento da atividade proliferativa e à redução da morte celular nas células infectadas (33, 37).

Tem sido muito estudado na literatura o papel do Ki67 para o diagnóstico das NIC, visto que não é incomum a discordância diagnóstica entre patologistas (33, 35, 38). Está bem estabelecido que, com o aumento do grau da NIC, as células em proliferação são encontradas em camadas mais superiores do epitélio e, nas NIC 3, também nas camadas superficiais (39). Além disso, a densidade nuclear nas camadas basais do epitélio, quando avaliada por métodos quantitativos, é diretamente proporcional ao grau da NIC (39). Em lesões de grau 2 e 3, são frequentes núcleos positivos no terço superior do epitélio e, nas NIC 3, a expressão de Ki67 foi 2,5 vezes maior que nas NIC1 (33).

O Ki67 também tem sua utilidade na diferenciação entre lesões benignas e NIC. Kruse AJ et al, 2002 (38) e Pirog EC et al, 2002 (35), observaram que a presença de pelo menos 2 núcleos positivos para o Ki67 em aglomerados ou ninhos (“clusters”), nos dois terços superiores do epitélio, é altamente sensível e específica para discriminar entre o epitélio normal (ou uma lesão benigna) e NIC1.

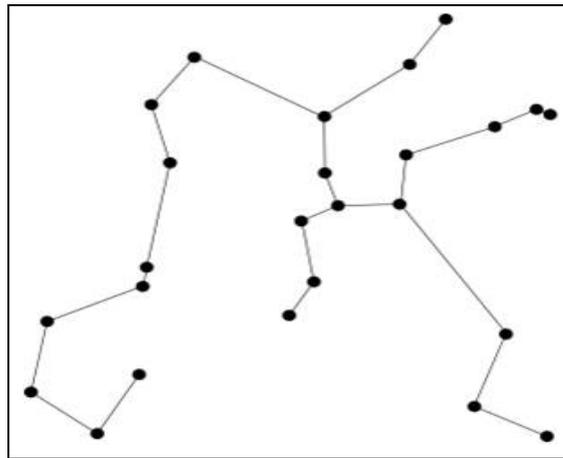
Desde que o Ki67 é um marcador com alta sensibilidade (33), em algumas circunstâncias sua interpretação pode ser dificultada como em: cortes tangenciais, que mostram núcleos positivos em camadas que podem ser confundidas como superficiais do epitélio; linfócitos positivos presentes no epitélio; áreas de erosão ou de metaplasia escamosa imatura, nas quais há maior expressão de Ki-67, não necessariamente associadas à infecção pelo HPV (35).

#### 1.4.1- Análise morfológica quantitativa (AMQ)

Com o intuito de minimizar a subjetividade e a discordância inter-observador na interpretação histológica, alguns autores têm proposto métodos quantitativos para a avaliação tecidual (40, 41). Métodos matemáticos, através de “software” ou programas, podem proporcionar ferramentas para a quantificação histológica, mostrando a interconexão entre as células e suas relações de vizinhança, analisando-se a população celular dentro da arquitetura tecidual (42). A Análise Morfológica Quantitativa, ou Análise da Estrutura Sintática, permite a avaliação de dados quantitativos a partir da distribuição espacial de pontos num espaço bidimensional (40). Este método reduz uma estrutura a pontos e linhas interligadas, gerando uma malha onde os núcleos são os pontos (ou vértices), unidos por linhas (arestas) (43).

Com base nestes conceitos, podem ser construídos modelos geométricos como:

a) **Árvore Geradora Mínima (*Minimum Spanning Tree - MST*):** conecta todos os objetos (pontos) numa população, de tal forma que a soma do comprimento das linhas entre estes pontos seja mínima (ou seja, é a menor distância entre vários pontos; Figura 4) (43).

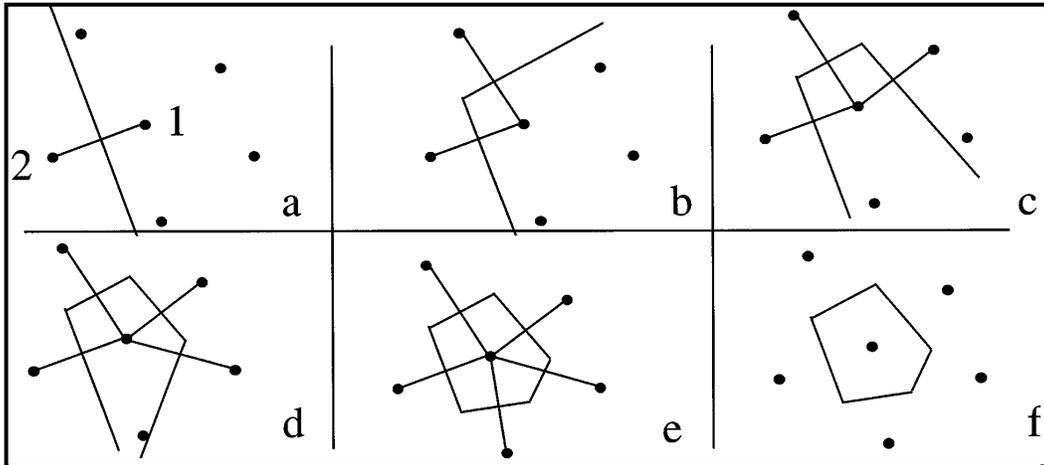


Fonte: <http://www.absoluteastronomy.com> (44)

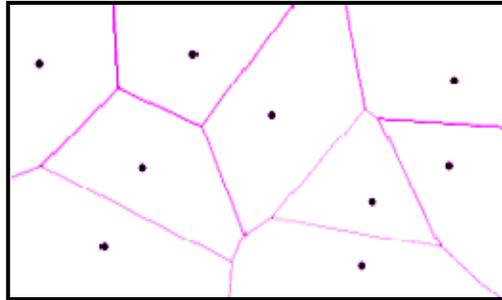
**Figura 4-** Demonstração da MST

Com o MST, podemos calcular as seguintes características: número de pontos (no caso, núcleos); comprimento máximo, mínimo, total e média das linhas do MST; número e porcentagem de pontos com um, dois, três vizinhos, etc., presentes em cada campo da imagem (45).

**b) Diagrama de Voronoi (DV):** o Diagrama de Voronoi de um conjunto de pontos consiste na partição do espaço em polígonos cujo interior está mais próximo de um dos pontos do que de qualquer outro (45). Em outras palavras, define relações de proximidade de um núcleo em relação aos outros, fornecendo informações quanto à distribuição celular (46; Figuras 5 e 6).



**Figura 5-** Como desenhar um polígono de Voronoi: seis pontos são representados. Em “a” o polígono de Voronoi do ponto denominado 1, é construído sequencialmente. Uma linha é desenhada, localizada a meia distância entre 1 e 2 e perpendicular à linha entre 1 e 2 é traçada uma mediana. Em “b”, o mesmo é feito. As duas medianas desenhadas terminam em sua intersecção (c) e um terceiro lado é desenhado agora. Em “d” e em “e” o polígono é completado. As linhas desenhadas entre 1 e cada um de seus vizinhos são apagadas, em “f” vemos o polígono de Voronoi. O ponto não fica necessariamente no centro do polígono. Pela definição, há somente um ponto por polígono (modificado a partir de Duyckaerts e Godefroy, 2000 - *apud* 46).

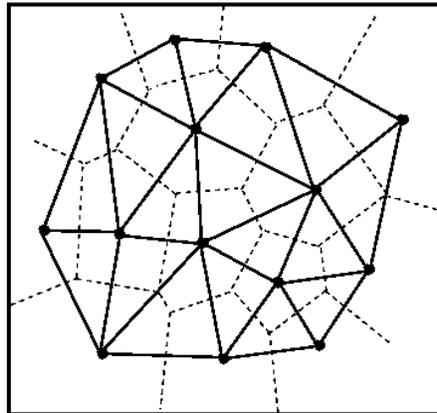


Fonte: [www.dma.fi.upm.es/.../DiagramaDeVoronoi.html](http://www.dma.fi.upm.es/.../DiagramaDeVoronoi.html) (47)

**Figura 6-** Diagrama de Voronoi

Do DV, derivam as seguintes variáveis: total de pontos marcados, área dos polígonos (assim como seus valores máximo, mínimo e a média), somatória das distâncias entre os pontos assinalados, densidade dos pontos numa determinada região do epitélio, etc. (45).

c) **Triangulação de Delaunay (TD):** o grafo dual (isto é, imagem “negativa”) do Diagrama de Voronoi é o Grafo de Delaunay. O Diagrama de Delaunay é o grafo cujos vértices são os pontos de Voronoi (41) - Figura 7.



Fonte: <http://www.comp.lancs.ac.uk/~kristof/research/notes/voronoi> (48)

**Figura 7-** Diagrama de Voronoi (linha tracejada) sobreposto à triangulação de Delaunay (linha cheia).

Além destas medidas, diante de um epitélio escamoso, um programa pode automaticamente calcular outras variáveis (39, 49), sendo as mais aplicáveis:

- Menor distância do núcleo positivo à camada basal e ao topo do epitélio;
- Espessura do epitélio no local onde o núcleo foi marcado;
- Índice de estratificação (IE): distância do núcleo à camada basal dividido pela espessura epitelial;
- Densidade dos núcleos positivos por  $\text{mm}^2$ ;
- Área da lesão.

#### 1.4.2- Aplicação da Análise Morfológica Quantitativa no estudo das Neoplasias Intra-epiteliais cervicais

A fim de se buscar uma interpretação mais precisa do diagnóstico de NIC em relação às lesões benignas, alguns autores têm quantificado a expressão de Ki67 através de programas variados. Os que mais se dedicaram a este estudo nas NIC através da análise morfológica quantitativa (AMQ) foram Kruse AJ e Baak JPA.

A partir da captura da imagem da lesão, um programa específico é capaz de avaliar diversas variáveis quantitativas, dentre as quais as mais importantes e reprodutíveis são: porcentagem e densidade de núcleos nas diversas camadas ou regiões do epitélio; distâncias dos núcleos positivos em relação à membrana basal ou à superfície epitelial; relação entre estas distâncias e espessura epitelial, assim como sua distribuição em percentis; relações espaciais entre os núcleos, etc. (38,49,50,51,52,53,54,55).

De acordo com a literatura, uma das variáveis mais estudadas e associada ao grau da NIC é o Índice de Estratificação (IE), definido como a relação entre a distância do núcleo marcado à camada basal e a espessura do epitélio (56,57). Este indica o quão alto está o núcleo marcado pelo Ki67 no epitélio. Assim, quanto maior o grau da NIC, maior o valor de IE (39). Quando o IE é distribuído em curva de percentis, é possível concluir que, dada porcentagem dos núcleos encontra-se abaixo de determinado valor de IE, por exemplo: ao se estudar o percentil 90 de um determinado valor de IE, 90% dos núcleos estarão abaixo deste valor (56,57).

Além disso, outras características também foram associadas com o grau das NIC. O número de núcleos positivos para Ki67 por 100 $\mu$ m da camada basal e a porcentagem de núcleos no terço superior e médio do epitélio foram proporcionalmente maiores quanto maior a gravidade da NIC, sendo que as NIC2 mostraram valores intermediários entre os das NIC 1 e 3 (39,56).

Ao estudar casos de NIC1, 2 e 3, Kruse AJ et al, 2001b (57), observaram que o valor do IE encontrou-se altamente associado com a presença de HPV de alto risco em casos de NIC. Pelos seus resultados, 90% dos casos com valor do IE maior que 0,6 foram positivos para HPV de alto risco oncogênico. Neste estudo o número de casos de NIC1 foi pequeno em relação aos de NIC 2 e 3.

Estas diversas variáveis foram avaliadas também em relação ao comportamento das NIC. Os aspectos mais relacionados à progressão tanto de NIC1 quanto de NIC2 foram o percentil 90 do IE e a porcentagem de núcleos positivos no terço médio do epitélio (39,58).

Apesar da análise quantitativa, os estudos de Kruse AJ et al, 2004c (51) também avaliaram subjetivamente a expressão deste marcador nas lesões cervicais. A quantidade de núcleos positivos na metade superior e inferior do epitélio foi significativamente diferente entre os grupos sem e com progressão, onde os casos que não progrediram mostraram expressão mais freqüente de Ki-67 na porção inferior do epitélio. Por outro lado, Baak JPA, 2006 (39) verificou que a presença de núcleos positivos isolados nos dois terços superiores do epitélio não se correlacionava ao comportamento das lesões de NIC.

Com o advento das técnicas de captura de imagem e do desenvolvimento de programas capazes das mais diversas aferições, a aplicação desta abordagem na avaliação do comportamento das lesões de NIC pode ser viável e muito interessante. Além disso, ainda nenhum estudo correlacionou a expressão de marcadores de proliferação epitelial e a presença de HPV pela hibridização *in situ*.

## **2- JUSTIFICATIVA**

---

O carcinoma de colo uterino é a segunda neoplasia mais frequente no mundo entre as mulheres e são conhecidas as suas lesões precursoras, as neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC).

A presença do Papiloma vírus Humano (HPV) é condição necessária para o desenvolvimento destas lesões. Numerosos tipos de HPV são conhecidos e são agrupados em tipos de alto e baixo risco oncogênico. Os HPV de alto risco (mais freqüentes HPV 16 e 18), são observados tanto em lesões de baixo grau ou NIC1, como de NIC 2 ou 3.

Apesar da maioria das NIC1 regredir espontaneamente, alguns casos evoluem para NIC 2 ou 3 e diversos estudos tentam encontrar características relacionadas à progressão das lesões de NIC1. Entre estas, a integração viral parece ser um dos fatores mais importantes e, o padrão puntiforme da reação da HIS, pode indicar se o HPV está integrado ao DNA do hospedeiro. Assim, estas mulheres com NIC1 com o aspecto puntiforme na HIS estariam mais propensas a progredir para lesões de alto grau e para o carcinoma.

Além disso, tem sido descrito que o padrão da expressão do Ki67 nas lesões de baixo grau mostra algumas características importantes relacionadas à progressão das lesões de NIC, quando estudados por métodos de análise de imagem quantitativa.

Apesar de haver muito estudo sobre as NIC, ainda não há nenhum que correlacione o padrão da HIS com a positividade do Ki67 e sua análise morfológica quantitativa. Buscamos com este trabalho, encontrar fatores indicadores do comportamento de lesões de NIC1, de fundamental importância para a orientação, conduta e acompanhamento das pacientes.

## **3- OBJETIVOS**

---

### 3.1- Gerais

Comparar os padrões da reação de hibridização *in situ* para HPV de alto risco com a expressão imunoistoquímica do Ki67 avaliada através da análise morfológica quantitativa em biópsias de colo uterino com diagnóstico de NIC1 que progrediram para lesão de alto grau (NIC2 ou 3) ou regrediram.

### 3.2- Específicos

3.2.1- Comparar as médias de idade entre os 3 grupos de pacientes com biópsia de NIC1: as que na biópsia subsequente: **a)** mantiveram o diagnóstico, **b)** as que evoluíram para NIC2 ou 3 e **c)** aquelas com regressão da lesão;

3.2.2- Verificar a frequência de positividade da reação da hibridização *in situ* para HPV de alto risco nos grupos de estudo;

3.2.3- Avaliar os diferentes padrões da reação de hibridização *in situ* com a evolução das lesões.

3.2.4- Verificar a expressão imunoistoquímica do Ki67 nas biópsias de NIC1 nos referidos 3 grupos de pacientes, através da avaliação simples e subjetiva da reação.

- 3.2.5- Avaliar a expressão imunistoquímica do Ki67 nas biópsias de NIC1 nos referidos 3 grupos de pacientes, através programa de análise morfológica quantitativa computadorizada, comparando a localização desta positividade nas camadas do epitélio escamoso com a sua evolução;
- 3.2.6- Comparar os dados da análise morfológica quantitativa computadorizada da expressão do Ki67 com os diferentes padrões da hibridização *in situ* nos três grupos de pacientes.

## **4- MATERIAL E MÉTODOS**

---

## **a- Grupos de estudo**

De um total de 1640 biópsias de NIC1 dos arquivos de biópsia do Departamento de Anatomia Patológica (DAP) da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP com diagnóstico de NIC1 no período de 2001 a 2006, 312 pacientes foram submetidas a um segundo procedimento, com estudo histológico, durante seu acompanhamento. Dentre estas, foram selecionados 74 casos que obedeciam aos seguintes critérios deste estudo: os prontuários foram analisados retrospectivamente, sendo que todas as pacientes apresentavam citologia prévia de NIC1 e, no seguimento, havia uma outra biópsia ou conização do colo uterino. De acordo com o diagnóstico do segundo procedimento, foram divididos em 3 grupos:

- 1- 29 casos continuaram com o diagnóstico de NIC 1;
- 2- 26 apresentaram progressão da lesão (NIC 2 ou 3);
- 3- 19 regrediram (diagnóstico apenas de cervicite).

Para compor os grupos 1 e 3, foram selecionadas exclusivamente pacientes que haviam sido submetidas a conização como segundo procedimento e, para o grupo 2, pacientes submetidas a outra biópsia cervical ou a cone. O intervalo de tempo entre os procedimentos variou de 6 a 42 meses, com uma média de 12 meses. Em todos os casos, apenas o material da primeira biópsia de cada paciente é que foi submetida ao estudo.

## **4.2- Avaliação histológica**

Os diagnósticos de todos os casos foram revistos por dois patologistas (RDMT e LALAA), com lesão de NIC1 ocupando pelo menos dois campos de grande aumento (40x).

### 4.3- Critérios de exclusão

- 1- Diagnóstico (citológico ou histológico) prévio de NIC 2, 3, ASC-US, ASC-H, AGUS ou carcinoma;
- 2- Pacientes gestantes ou HIV positivas;
- 3- Pacientes sob terapia imunossupressora;
- 4- Lesão menor que dois campos de grande aumento na biópsia ou com discordância de diagnóstico entre os patologistas (RDMT e LALAA);
- 5- Material com artefatos ou problemas de fixação.

### 4.4- Técnica de hibridização *in situ* para HPV

A reação de hibridização *in situ*, utilizando o Sistema GenPoint® de amplificação de sinal (DAKO) para HPV de alto risco (tipos 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 69 - código Y1443), foi realizada no Laboratório de Patologia Experimental (CAISM, UNICAMP), seguindo os protocolos do fabricante. No bloco de cada caso, foram feitas secções de 4µm de espessura e o material colocado em lâminas previamente silanizadas. A desparafinização foi obtida com dois banhos de xilol, cada um por 5 minutos, seguidos de dois banhos de álcool absoluto e três de álcool a 95%, cada um por um minuto, e finalmente lavadas em água destilada. A seguir, foram imersas em pepsina a 0,8%, à temperatura de 37°C, por 5-10 minutos, e lavadas novamente em água destilada, para a digestão enzimática. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito através de imersão em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,3% em metanol durante 20 minutos, em temperatura ambiente. O material foi então submetido à hibridização, pingando-se a sonda e depois colocado em placa de aquecimento por 5 minutos, a 92°C, e transferido para câmara úmida a 37°C, "overnight". Na manhã seguinte, procedeu-se à lavagem posterior em solução tampão TBST (*Tris-Buffered Saline Tween*, DAKO - código S3306), e depois em solução estrigente, a 48°C, por 20-30 minutos. As lâminas

então foram lavadas novamente, três vezes em TBST, por 1 minuto, e aplicado o conjugado estreptavidina-HRP primário na diluição de 1:100 sobre o preparado histológico, e incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Após lavagem com TBST, foi administrado o reagente de amplificação (biotinil tiramida). Em seguida, foi colocado o conjugado estreptavidina-HRP secundário e as lâminas lavadas em solução salina tampão (PBS - *phosphate buffer saline*). A coloração foi efetuada utilizando-se o substrato marrom DAB (3,3 tetra-hidrocloro de diamino-benzidina) e a contra-coloração com hematoxilina. As lâminas foram montadas com resina e lamínula e avaliadas histologicamente.

Dois casos de NIC3 previamente positivos em reações anteriores foram usados como controle positivo da reação. O controle negativo resultou da reação com os casos positivos sem a utilização da sonda.

#### **4.5- Avaliação da reação de hibridização *in situ***

Foram considerados positivos os casos com marcação nuclear de reação, seguindo-se os padrões descritos na literatura:

- difuso (positivo em todo o núcleo);
- puntiforme (também chamado de “dot”);

O epitélio foi dividido em três terços: região basal, intermédia e superficial. Nos casos com reação positiva, foram avaliados:

- 1) o número absoluto de núcleos puntiformes e difusos;
- 2) a distribuição das células positivas, classificadas pelo padrão de reação, em cada região do epitélio (basal, intermédia e superficial).

A contagem dos núcleos foi realizada no próprio microscópio, por dois patologistas (RDMT e LALAA); os dados tabulados foram analisados qualitativa e quantitativamente entre os 3 grupos de estudo.

A idade das pacientes também foi considerada.

#### 4.5.1- Análise estatística

A análise dos resultados da HIS foi realizada com a colaboração de um profissional da área de estatística (SM). Os dados foram descritos através de média, desvio-padrão, mediana, valores mínimos e máximos (análise quantitativa), frequências absolutas (n) e relativas (%). Foram testados quanto à distribuição normal através do teste de Kolmogorv-Smirnov, e quando esta não ocorreu, foram realizados testes não paramétricos para os valores médios e medianos.

A idade foi estudada entre os casos positivos e negativos, e quanto à evolução através do teste de Mann-Whitney.

#### **a) Análise qualitativa**

Para esta avaliação, foram considerados casos positivos (com pelo menos 1 núcleo positivo) e negativos. Os dados foram analisados em relação à significância através do teste exato de Fischer, sensibilidade, especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN), índice *kappa* (concordância entre medidas categóricas) e seu respectivo intervalo de confiança (95%). Ainda foi verificado se existiam núcleos somente puntiformes ou somente difusos em cada camada, e o percentual de casos de cada padrão foi estudado em relação aos grupos através de Teste exato de Fischer.

## **b) Análise quantitativa**

A análise quantitativa foi realizada como se segue: todos os núcleos positivos (difuso ou puntiforme) em toda a lesão de cada biópsia foram contados em cada porção do epitélio, resultando num total de núcleos positivos em toda a espessura epitelial. A razão entre o número de núcleos positivos, de acordo com o padrão da reação, em cada região e o número total de células positivas no epitélio foi calculada em cada caso, assim como os valores percentuais. O valor médio e a correspondente porcentagem média dos núcleos positivos em cada grupo foram calculados. Os valores médios absolutos e de porcentagem foram comparados entre os dois grupos, utilizando o teste de Mann-Whitney.

O nível de significância assumido foi de 5% e o “software” utilizado para análise foi o SAS versão 8.2.

## **4.6- Reação imunoistoquímica para Ki67**

A reação imunoistoquímica para o marcador de proliferação celular Ki67 (clone MIB1, DAKO, diluição 1:50) foi realizada no Laboratório de Patologia Experimental (CAISM, UNICAMP), em todos os casos.

As lâminas foram desparafinizadas com banho em xilol a 110°C e posterior passagem em mais dois xilóis à temperatura ambiente. Após, as lâminas foram banhadas em três álcoois absolutos, um álcool 80% e um álcool 50% para hidratação progressiva. Foram, então, lavadas em água corrente por três minutos e passadas em água destilada.

Para inibição da peroxidase endógena, as lâminas passaram por três banhos de 3 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3%, à temperatura ambiente e novamente lavada em água corrente por 3 minutos e passadas em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com a imersão das lâminas em tampão Tris-EDTA 0,05M pH 8,9, durante 30 minutos, a cerca de 95°C, em panela a vapor, com esfriamento subsequente por 15 a 20 minutos. Após, foram lavadas em água corrente e água destilada.

O anticorpo primário foi gotejado sobre o preparado histológico na diluição supracitada, e as lâminas incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos. Após, foram incubadas “*overnight*” (16-20 horas) a 4°C em câmara úmida.

Posteriormente, foram lavadas três vezes em (PBS - *phosphate buffer saline*), pH 7,4, à temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas por uma hora a 37°C com um coquetel de polímeros marcado com peroxidase, sendo utilizado o sistema de detecção EnVision Plus (DAKO), e, após, novamente imersas em PBS.

A coloração foi realizada com 60mg de DAB (3,3 tetra-hidroclorato de diamino-benzidina, SIGMA D5637) - cromógeno marrom - na proporção para 100 ml de PBS e 1500 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10 volumes e 1 ml de DMSO, por 5 minutos a 37°C. O material foi lavado em água corrente, contra-corado com hematoxilina, desidratado (três banhos de álcool etílico absoluto e três de xilol) e as lamínulas montadas com resina de Entellan<sup>®</sup>.

Além dos casos dos três grupos em questão, para comparação e controle de reação imunoistoquímica para Ki67, foram selecionados 6 casos de colo uterino normal dos arquivos do DAP, de peças de histerectomia por doença benigna de pacientes em idade reprodutiva, e sem história prévia de lesões pelo HPV. O esperado é a positividade de reação apenas na camada basal do epitélio escamoso do colo uterino.

## **4.7- Análise da expressão do marcador Ki67**

### **a) Análise subjetiva**

Inicialmente, foi realizada uma análise baseada na simples leitura da reação do Ki67, a qual denominaremos de análise subjetiva da expressão do Ki67. Com avaliação ao microscópio de co-observação, 2 patologistas (RDMT e LALAA), classificaram esta expressão imunoistoquímica em:

- positividade exclusiva nas camadas basal e para-basal do epitélio;
- núcleos positivos até metade da espessura epitelial;
- positividade em mais da metade do epitélio.

A camada basal considerada foi aquela adjacente à membrana basal, e a camada para-basal, definida como logo acima da basal.

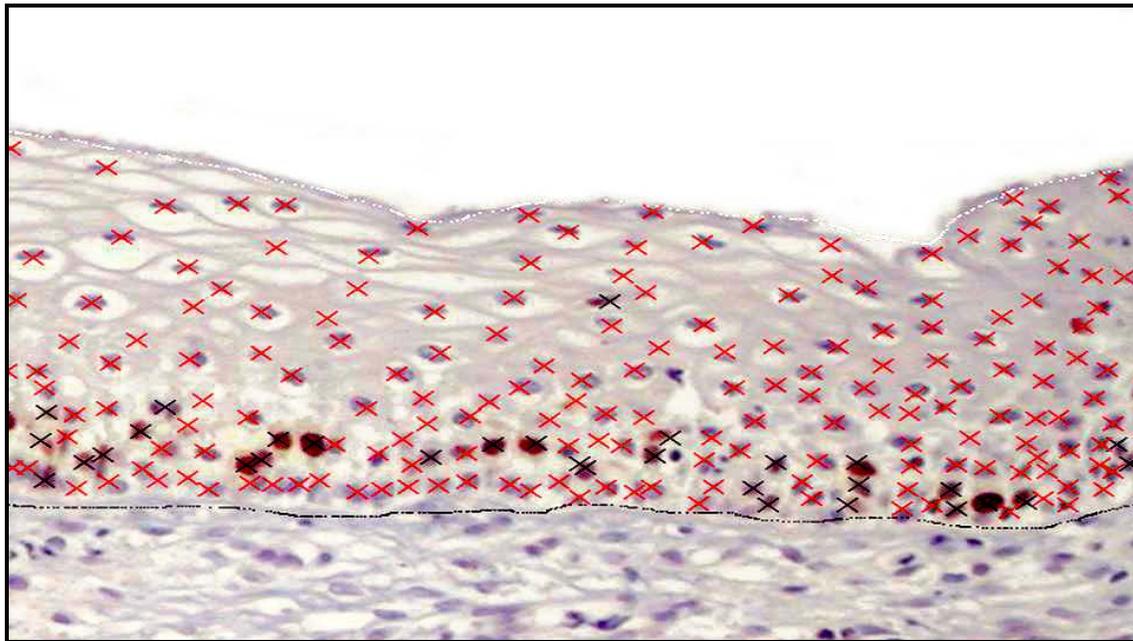
Os casos com cada padrão de marcação no epitélio foram contados e os dados tabulados para análise estatística subsequente.

### **b) Análise morfológica quantitativa**

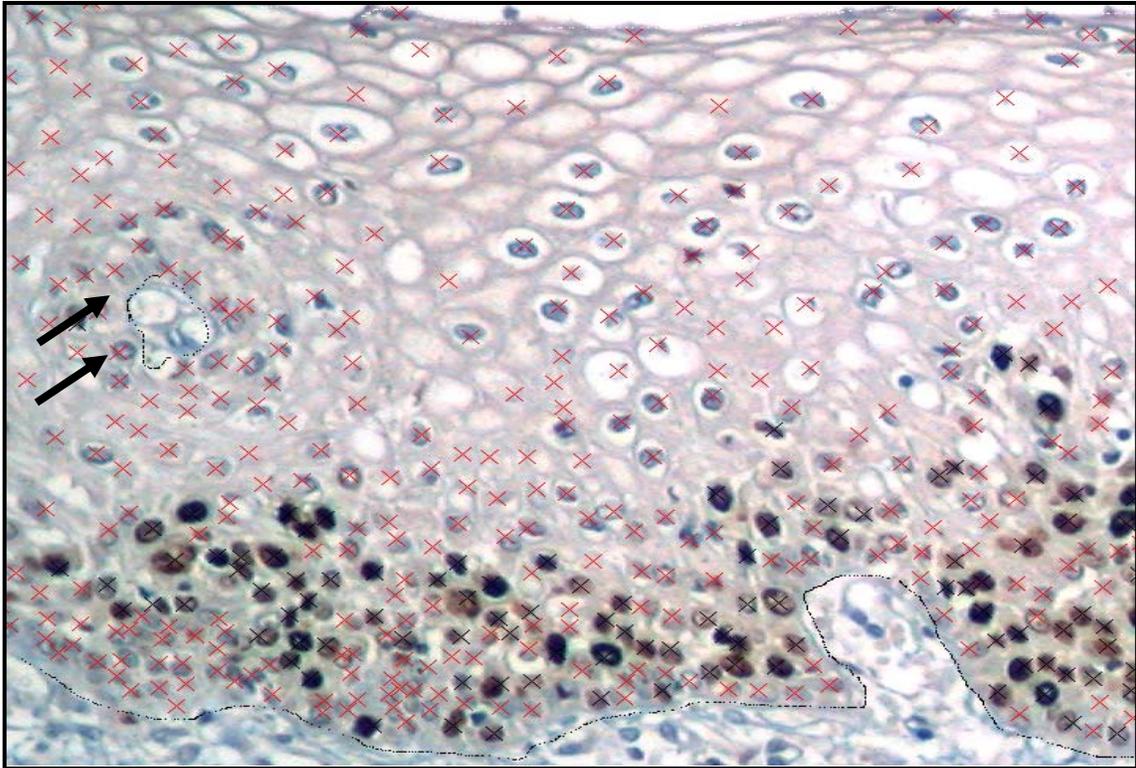
As lâminas da reação imunoistoquímica ao Ki67 foram fotografadas com câmera digital Nikon, modelo 995, em arquivo TIFF e convertidas para arquivo BMP, devido à configuração do programa a ser utilizado. Toda a extensão da lesão foi documentada, com objetiva em aumento de 10X e de cada caso, pelo menos 2 imagens foram obtidas.

As imagens foram transferidas para o computador e analisadas por um programa desenvolvido na UNICAMP, denominado “Sociology” (programa a ser registrado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, desenvolvido pelo Dr. Luís Randall Adam, pesquisador colaborador da UNICAMP), sendo marcados em todas as fotos os núcleos positivos com cor preta e os negativos com cor

vermelha. Também foram assinalados com o cursor a base (em preto) e o topo (em branco) do epitélio, em linhas contínuas, sendo a área analisada correspondente à região determinada por estas duas linhas (Figura 8). Foi evitada a demarcação de áreas com corte tangencial do epitélio, reconhecidas pela presença de papilas, focos intraepiteliais de estroma, ou ainda focos concêntricos de células parabasais e basais. Quando não foi possível evitá-las, a membrana basal presente foi demarcada com o cursor (Figura 9).



**Figura 8-** Com o cursor são marcados: núcleos Ki67 positivos (“x” preto); negativos (“x” vermelho); membrana basal (linha preta) e topo do epitélio (linha branca).



**Figura 9-** Pode-se notar, neste caso, a irregularidade da membrana basal, assim como área em corte tangencial, cuja membrana basal foi também marcada (seta).

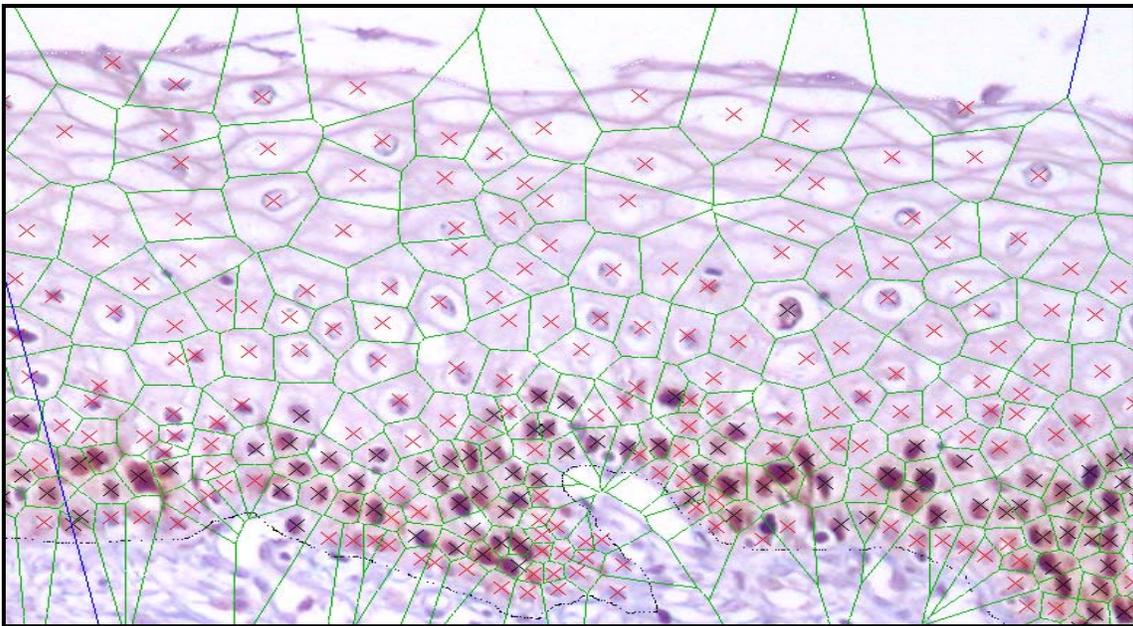
O programa automaticamente calcula diversas medidas, sendo as mais aplicáveis:

- menor distância do núcleo positivo à camada basal e ao topo do epitélio;
- espessura do epitélio no local onde o núcleo foi marcado;
- Índice de estratificação (IE): distância do núcleo à camada basal dividido pela espessura epitelial;
- densidade dos núcleos positivos por  $\text{mm}^2$ ;
- área da lesão.

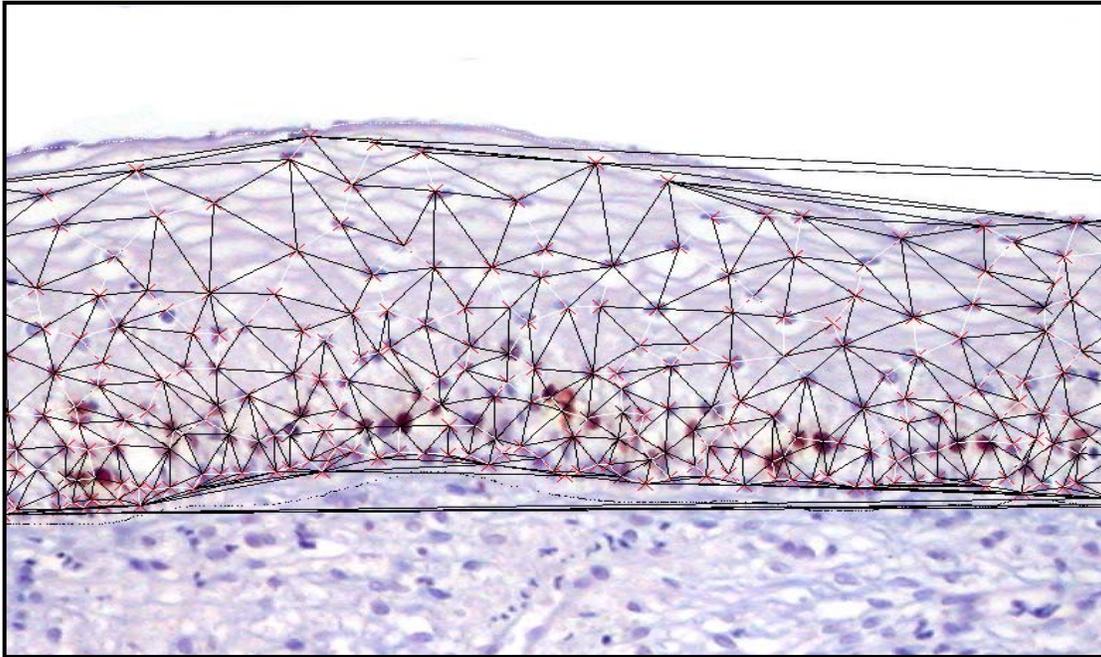
Este programa também permite a avaliação de fatores de relação entre os núcleos e suas derivadas, como:

- Diagrama de Voronoi (DV);
- “Árvore Geradora Mínima” (*Minimum Spanning Tree* - MST);
- Triangulação de Delaunay;
- Distribuição e densidade de núcleos nas camadas do epitélio.

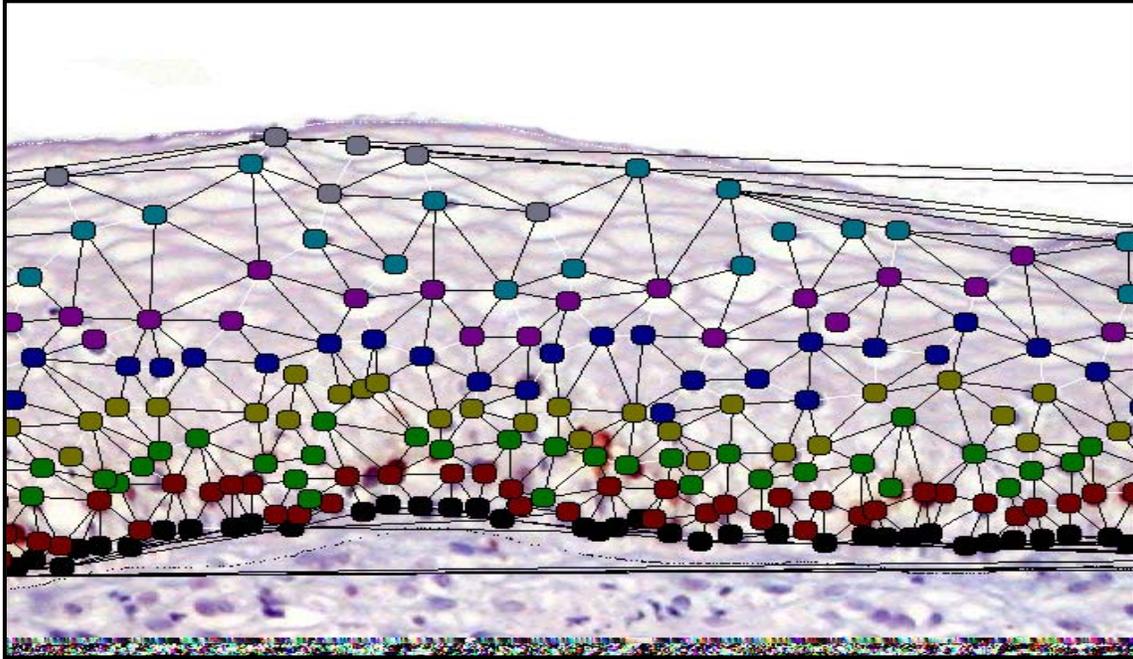
Todos estes cálculos foram realizados pelo programa em cada imagem, e os valores obtidos em cada caso correspondem à média de todos os campos avaliados (Figuras 10, 11 e 12).



**Figura 10-** Diagrama de Voronoi gerado pelo programa “Sociology”.



**Figura 11-** A triangulação de Delaunay é automaticamente calculada. Podem ser observados: triângulos entre núcleos positivos, entre negativos e constituídos por núcleos positivos e negativos.



**Figura 12-** Distribuição dos núcleos nas diversas camadas epiteliais, onde cada cor corresponde a uma camada.

#### 4.7.1- Análise estatística

##### **a) Análise subjetiva**

A partir da positividade do Ki67 em cada porção epitelial, os dados foram catalogados em uma tabela, verificando-se a relativa expressão entre:

- o grupo em que a lesão regrediu *versus* aquele que manteve NIC1;
- o grupo que permaneceu NIC1 *versus* o que progrediu;
- o grupo com regressão *versus* o que progrediu.

Foram testados quanto à distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov, e quando esta não ocorreu, foram realizados testes não paramétricos, como Chi-quadrado e exato de Fischer (ambos para variáveis

categóricas, sendo o último aplicado quando os valores esperados foram menores que cinco). O nível de significância assumido foi de 5% e o “software” utilizado para análise foi o SAS versão 8.2.

### **b) Análise morfológica quantitativa**

O programa fez o cálculo automático de diversas variáveis em cada campo, sendo o resultado final de cada caso decorrente da média entre todas as imagens da lesão. Os resultados foram transferidos para uma tabela no programa WINSTAT, versão 3.1, 1995. Foram calculados os resultados e a relação entre os 3 grupos.

Do programa podem ser avaliadas inúmeras medidas, porém foram selecionadas as mais relevantes do ponto de vista de reprodutibilidade e interpretação prática:

- densidade de núcleos positivos por  $\text{mm}^2$ ;
- área da lesão e a espessura epitelial;
- núcleos positivos ou negativos nas camadas ou terços epiteliais;
- relações de vizinhança entre os núcleos;
- percentil 90 do Índice de Estratificação.

O teste estatístico usado para a comparação dos resultados entre os grupos foi o ANOVA (“analysis of variance” - comparação entre mais de 2 grupos). Esta avaliação estatística foi realizada em conjunto com co-orientador (KM).

#### **4.8- Aprovação pelo comitê de ética em pesquisa**

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob o protocolo número 490/2006. Por se tratar de trabalho retrospectivo em material biológico parafinado de arquivo, foi dispensada a utilização do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## **5- RESULTADOS**

---

## 5.1- Hibridização *in situ* (HIS)

Dos 74 casos, 29 mantiveram o diagnóstico de NIC 1 na segunda biópsia; houve progressão para NIC 2-3 em 26 casos e 19 mostraram apenas cervicite no procedimento subsequente. A idade variou de 16 a 65 anos, com a média de 28,6. A média de idade dos casos que não evoluíram foi de 26 anos, enquanto que daqueles com progressão foi de 31, dado estatisticamente significativo ( $p=0,02$  - teste de Mann-Whitney).

Das 74 biópsias, a reação de hibridização *in situ* para HPV de alto risco foi positiva em 22 (30%), dos quais 11 mantiveram diagnóstico de NIC1, 3 regrediram e 8 evoluíram com progressão. Dos 26 casos com progressão, somente 8 foram positivos na HIS (31%) e 18 negativos (69%). A reação de HIS foi repetida em todos os casos negativos, com diferentes tempos de digestão enzimática e, mesmo assim, a positividade do método foi baixa.

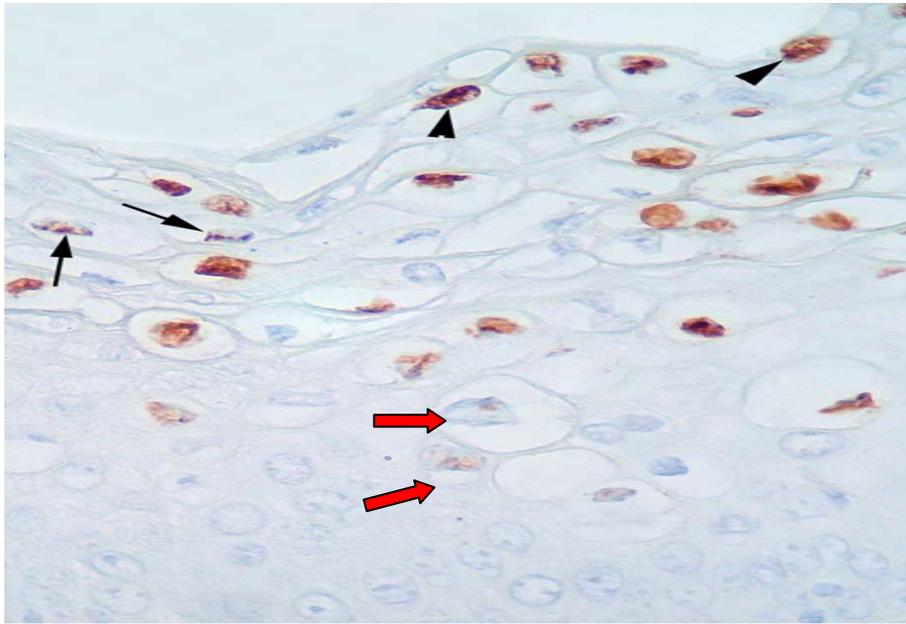
Devido ao relativo baixo número de casos positivos à HIS, os grupos 1 e 3 foram estudados em conjunto e denominados como casos sem progressão, e os dados foram comparados ao grupo 2, dos casos com progressão.

Os resultados estão apresentados em tabelas e como não houve distribuição normal através do teste de Kolmogorv-Smirnov, foram realizados testes não-paramétricos:

- Teste de Mann-Whitney: para comparar variáveis contínuas entre os grupos;
- Teste exato de Fischer: para comparar variáveis categóricas entre os grupos.

### 5.1.1- Análise qualitativa

Os padrões de positividade (Figura 13) e sua localização e distribuição no epitélio são demonstrados na Tabela 1.



**Figura 13-** Padrões da reação de HIS: observam-se núcleos positivos difusos (cabeças de seta) e puntiformes (setas), presentes especialmente nas camadas superficiais do epitélio, porém alguns nas camadas intermédias (setas vermelhas).

A positividade da reação de HIS ao HPV de alto risco oncogênico não foi estatisticamente diferente entre os grupos com e sem progressão. O padrão difuso de reação foi mais comum na região superficial do epitélio em ambos os grupos estudados (com e sem progressão). O sinal puntiforme foi observado em todas as camadas epiteliais. Todos os casos positivos expressaram marcação difusa e puntiforme nas porções superficial e intermédia do epitélio, e a presença de núcleos puntiformes nas camadas superficiais não se associou à progressão. Por outro lado, o padrão puntiforme nas camadas basais foi mais observado no grupo com progressão, mas não foi significativo estatisticamente ( $p=0,13$ ). Os resultados qualitativos mostraram baixa sensibilidade, baixo valor preditivo positivo e o índice kappa foi sempre baixo, variando de -0,19 a 0,39 (Tabela 1) para as características morfológicas.

**Tabela 1-** Avaliação qualitativa dos padrões de reação da HIS, sua distribuição nas diferentes porções do epitélio e a evolução da lesão.

Terço do Epitélio	Padrão	Com	Sem	<i>p</i>	Especif. IC:95%	Sensib.	VPP	Índice kappa
		progressão N=8	progressão N=14					
<b>B</b>	<b>D</b>	1	0	0.36	100	12.5	100	0.15
	<b>P</b>	4	2	0.13	85,7	50	66,7	0.38
<b>I</b>	<b>D</b>	2	4	1.0	71,4	25	33,3	-0.04
	<b>P</b>	8	12	0.51	14,3	100	40	0.11
<b>S</b>	<b>D</b>	7	9	0.35	35,7	87.5	43,8	0.19
	<b>P</b>	6	14	0.12	0	75	30	-0.19

**B:** basal; **I:** intermédio; **S:** superficial; **D:** difuso; **P:** puntiforme; **VPP:** valor preditivo positivo

#### 5.1.2- Análise quantitativa

Analisando-se o número absoluto de núcleos puntiformes e difusos em cada região do epitélio, os casos que progrediram para NIC2 e 3 apresentaram média significativamente maior de núcleos puntiformes no terço basal do epitélio, quando comparado com o grupo que não mostrou progressão ( $p=0,05$ ). Observou-se também que a média de núcleos com expressão difusa foi maior na porção superficial do epitélio no grupo que não progrediu em comparação àquele com progressão, porém, esta diferença não atingiu o nível de significância estatística (Tabela 2;  $p=0,7$ ).

**Tabela 2-** Distribuição do número absoluto mínimo e máximo de núcleos positivos, número médio e DP em relação ao padrão do sinal na HIS nas diversas regiões do epitélio.

		Sem progressão (N=14)				Com progressão (N=8)				
Terço do epitélio	Padrão	Mínimo	Máximo	Média	DP	Mínimo	Máximo	Média	DP	p
		<b>B</b>	<b>D</b>	0	0	0,0	0,0	0	3	
	<b>P</b>	0	3	<b>0,3</b>	0,8	0	24	<b>4,5</b>	8,1	<b>0,05*</b>
<b>I</b>	<b>D</b>	0	84	8,4	22,4	0	31	7,5	13,9	1,00
	<b>P</b>	0	54	15,9	17,2	1	28	10,3	8,6	1,0
<b>S</b>	<b>D</b>	1	150	<b>30,9</b>	49,2	0	23	<b>10,4</b>	8,1	0,73
	<b>P</b>	29	37	17,4	10,3	3	42	11,0	14,1	0,12

**B:** basal; **I:** intermédio; **S:** superficial; **D:** difuso; **P:** puntiforme; **DP:** desvio padrão

Considerando a porcentagem de células com diferentes padrões de marcação da HIS ao longo do epitélio (Tabela 3), o valor máximo e as médias do sinal puntiforme na região basal foram de 4,1% e 0,5%, respectivamente, no grupo sem progressão, enquanto, no que progrediu, estes valores subiram para 58,5% e 11%, mostrando diferença estatística significativa ( $p=0,05$ ). Por outro lado, podemos observar que o sinal puntiforme, na camada superficial do epitélio, mostrou uma relação diferente, associando-se aos casos sem progressão (Tabela 3;  $p=0,04$ ).

Quando os valores percentuais médios em cada região do epitélio foram comparados entre os grupos, a distribuição de núcleos positivos foi diferente. No grupo sem progressão houve maior porcentagem de núcleos positivos concentrados na região superficial (Tabela 3;  $p=0,04$ ), enquanto o que progrediu mostrou distribuição mais uniforme nas três porções epiteliais e positividade na porção basal mais freqüente (Tabela 3).

**Tabela 3-** Número percentual de células nas diferentes porções epiteliais de acordo com o padrão do sinal na HIS e o comportamento da lesão.

Terço do epitélio e padrão de reação	Com progressão			Sem progressão			<i>p</i>
	média	mínimo	máximo	média	mínimo	Máximo	
<b>Basal Difuso</b>	0.6%	0.0	4.5%	0.0	0.0	0.0	0.23
<b>Basal Puntiforme</b>	11.0%	0.0	58.5%	0.5%	0.0	4.1%	<b>0.05*</b>
<b>Intermédio Difuso</b>	8.8%	0.0	47.0%	4.1%	0.0	27.5%	0.96
<b>Intermédio puntiforme</b>	35.8%	7.5%	100.0%	23.6%	0.0	54.1%	0.24
<b>Superficial Difuso</b>	24.4%	0.0	50.0%	27.3%	0.0	59.9%	0.83
<b>Superficial Puntiforme</b>	19.4%	0.0	43.2%	44.6%	5.9%	100.0%	<b>0.04*</b>

A relação entre o número de sinais puntiformes e difusos foi calculada em cada caso, obtendo-se um coeficiente. O coeficiente médio dos casos de cada grupo (com e sem progressão) foi calculado e feita a comparação entre os grupos (teste de Mann-Whitney, Tabela 4). Observou-se que este coeficiente médio era 3,5 vezes maior no grupo em que as lesões progrediram, notando-se aí uma maior frequência de sinais puntiformes, embora com valores estatísticos ainda não significantes (Tabela 4,  $p=0,08$ ).

**Tabela 4-** Coeficiente entre o número de núcleos de padrão puntiforme e difuso pela HIS e sua correlação com a evolução da lesão

	Sem progressão	Com progressão
<b>média</b>	<b>1.2</b>	<b>3.5</b>
<b>mediana</b>	0.5	1.4
<b>máximo</b>	8.3	19.5
<b>mínimo</b>	0	0
<b>Valor de <i>p</i></b>	<b>0.0812</b>	

## 5.2- Ki-67

### a) Análise Subjetiva

A distribuição epitelial da expressão do Ki67 nos três grupos do estudo está apresentada na Tabela 5. Para controle da reação foram utilizados 6 casos de epitélio cervical normal, provenientes de histerectomia, os quais mostraram expressão do Ki67 apenas nas camadas basal e para-basal do epitélio.

**Tabela 5-** Distribuição da expressão do Ki67 nas diferentes regiões do epitélio nos grupos estudados.

<b>GRUPO</b>	<b>Positividade em camada basal e para-basal</b>	<b>Positividade até a metade do epitélio</b>	<b>Positividade acima da metade do epitélio</b>
<b>Com REGRESSÃO</b> (n=19)	3	8	8
<b>MANUTENÇÃO de NIC1</b> (n=29)	6	15	8
<b>Com PROGRESSÃO</b> (n=26)	5	5	16

Para a comparação entre os grupos, foram realizados os seguintes testes estatísticos, com os respectivos valores de p:

- entre o grupo que regrediu e o que manteve NIC1:  $p = 0,5785$  (teste de Chi-quadrado);
- entre o que manteve NIC1 e o que progrediu:  $p = 0,0222$  (teste de Chi-quadrado);
- entre o grupo com regressão e o que progrediu:  $p = 0,2788$  (teste Exato de Fisher).

Os testes fazem a comparação entre variáveis categóricas. O teste do Chi-quadrado foi utilizado quando pelo menos 25% dos valores esperados foram maiores que 5 (primeiros dois grupos de comparação), e o de Fischer quando estes valores foram menores que 5.

Observou-se que apenas houve diferença estatística entre o grupo que permaneceu com o diagnóstico de NIC1 e o que progrediu ( $p=0,02$ ). Quando agrupamos os casos em apenas 2 categorias: com progressão e sem progressão, observa-se que a expressão do Ki67 também mostra diferença significativa (Tabela 6;  $p= 0,0338$ , teste de Chi-quadrado).

**Tabela 6-** Distribuição da expressão do Ki67 nas diferentes porções do epitélio e sua relação entre os casos com ou sem progressão da lesão de NIC1.

<b>Evolução</b>	<b>Camada basal e para basal</b>	<b>Até a metade do epitélio</b>	<b>Mais da metade do epitélio</b>
<b>Regressão ou manutenção de NIC1 (n=48)</b>	9	23	16
<b>Progressão da lesão (n=26)</b>	5	5	16

Chi-quadrado  $p=0,0338$

Podemos assim afirmar que, pela simples leitura da reação, a expressão do Ki67 em camadas mais altas do epitélio escamoso está fortemente associada à progressão da lesão de NIC1.

## **b) Análise Morfológica Quantitativa**

Para todas as medidas avaliadas, foi utilizado o teste ANOVA, para a comparação entre os 3 grupos (1. regressão, 2. manutenção de NIC1 e 3. progressão para NIC 2-3). Entre as diversas variáveis estudadas (densidade de

núcleos positivos por mm<sup>2</sup>; área da lesão e a espessura epitelial; núcleos positivos ou negativos nas camadas ou terços epiteliais; relações de vizinhança entre os núcleos; percentil 90 do Índice de Estratificação), algumas mostraram diferenças significativas entre o grupo com regressão e os dois outros. Estes dois últimos grupos mostraram resultados muito semelhantes entre si (Tabelas 7 e 8).

Assim, a densidade de núcleos positivos por mm<sup>2</sup> no epitélio foi significativamente menor no grupo com regressão. Associado a esta medida, o número de triângulos formados entre os núcleos e o número de vértices do MST também foram menores nos casos que regrediram ( $p=0,0019$  - Tabela 7).

Não foram constatadas diferenças nas medidas da espessura epitelial e nem na área de lesão entre os grupos (Anexo 2,  $p=0,09$  e  $0,69$ , respectivamente). Por outro lado, mesmo sem diferenças significativas, verifica-se que os valores para estas variáveis foram gradualmente crescentes entre os casos que regrediram, mantiveram NIC1 e progrediram.

**Tabela 7-** Densidade nuclear, número de triângulos formados e de vértices nos 3 grupos.

	Densidade nuclear/mm <sup>2</sup>	Número de triângulos	Número de vértices
<b>REGRESSÃO</b>	114,7	698,4	359,8
<b>MANUTENÇÃO de NIC1</b>	177,1	987,4	505,5
<b>PROGRESSÃO</b>	165,8	913,6	468,2
<b>Valor de p</b>	0,0019	0,019	0,019

A distribuição arquitetural dos núcleos na lesão foi averiguada através das relações de vizinhança, que medem a distância do núcleo marcado até o núcleo vizinho mais próximo e, da quantidade de vizinhos de cada núcleo (obtida com a Triangulação de Delaunay e a MST). Observou-se que espacialmente a disposição nuclear nos casos com regressão é diferente dos outros dois grupos (Tabela 8). Com estes resultados, fica claramente demonstrado pela análise quantitativa que os casos que regrediram mostraram menor densidade de núcleos marcados pelo Ki67, com conseqüente quantidade de vizinhos significativamente menor (Tabela 8,  $p=0,008$ ) e mais distantes entre si (Tabela 8,  $p=0,02$ ). Os casos que permaneceram como NIC1 ou progrediram mostram a distribuição nuclear de forma mais compacta do que os casos com regressão.

**Tabela 8-** Relação de vizinhança entre os núcleos medida pela distância ao vizinho mais próximo e pela média do número de vizinhos por núcleo

<b>EVOLUÇÃO</b>	<b>Distância do vizinho mais próximo</b>	<b>Média do número de vizinhos</b>
<b>REGRESSÃO</b>	22,55	5,83
<b>MANUTENÇÃO de NIC1</b>	20,11	5,87
<b>PROGRESSÃO</b>	19,63	5,87
<b>Valor de <math>p</math></b>	0,02	0,008

Por outro lado, o Índice de Estratificação e seu percentil 90, que avaliam a altura dos núcleos positivos no epitélio, foram semelhantes entre os três grupos (Anexo 2,  $p=0,26$  e  $0,12$ , respectivamente).

Desta forma, verificamos que as medidas obtidas pela análise morfológica quantitativa não apontaram características de progressão, porém conseguiram destacar indicadores de regressão das lesões.

**c) Comparação entre a avaliação subjetiva do Ki67 e os resultados da hibridização *in situ***

Dentre os 74 casos estudados, 32 exibiram positividade do Ki67 em mais da metade do epitélio (Tabela 9). Destes, a metade foi positiva para HPV de alto risco na reação de HIS. Correlacionando a reação HPV positiva com a marcação do Ki67 em mais da metade do epitélio, encontramos 16 casos, dos quais: 13 permaneceram com diagnóstico de NIC1 ou progrediram para NIC2-3 (13/16=81%) e 3 casos regrediram. Notou-se, também que, dos 22 casos positivos para HPV pela HIS, 73% (16 casos) mostravam Ki67 positivo em mais da metade da espessura epitelial, 18% (4 casos) até a metade e em 9% (2 casos) apenas nas camadas basal e para-basal (Tabela 9).

**Tabela 9-** Expressão do Ki67 em diferentes níveis do epitélio e sua relação com a positividade do HPV e a evolução da lesão.

Positividade	Ki67		HPV+	
	N (%)	N (%)	Manutenção ou progressão	Regressão
Camadas Basal e para-basal	14 (19%)	2 (9%)	2 (9%)	0
Até a metade	28 (38%)	4 (18%)	4 (18%)	0
Mais da metade	32 (43%)	16 (73%)	13 (59%)	3 (14%)
<b>Total</b>	<b>74 (100%)</b>	<b>22 (100%)</b>	<b>19 (86%)</b>	<b>3 (14%)</b>

Observa-se na Tabela 9 que a maioria dos casos HPV positivos (59%) esteve associada à expressão do Ki67 em mais da metade do epitélio, os quais estão englobados no grupo que apresentou manutenção (6 casos) ou progressão (7 casos) da lesão. Quando se avalia o padrão do sinal da HIS com a expressão do Ki67, observa-se que todos os casos com expressão puntiforme da HIS na camada basal mostraram positividade ao Ki67 em mais da metade do epitélio (6 casos).

**d) Comparação entre análise morfológica quantitativa do Ki67 e os resultados da Hibridização *in situ***

Ao comparar os resultados da hibridização *in situ* com as várias medidas obtidas pelo programa a partir dos cortes com a reação do Ki67, observou-se que tanto a densidade nuclear quanto o número de vértices do MST foram maiores nos casos positivos para HPV de alto risco oncogênico em relação aos sem expressão viral, sendo esta diferença significativa ( $p=0,05$  e  $0,02$ , respectivamente - Tabela 10 - teste de Mann-Whitney). As demais variáveis (como espessura epitelial, número de triângulos, Índice de Estratificação) não mostraram diferença estatística entre os casos positivos e negativos na HIS ( $p=0,19$ ;  $0,8$  e  $0,24$ , respectivamente).

**Tabela 10-** Comparação entre a densidade de núcleos positivos para Ki67 e número de vértices do MST em relação à positividade para HPV de alto risco oncogênico pela HIS.

HIS	Núcleos Ki67 positivos	
	Densidade/mm <sup>2</sup> (média)	Número de Vértices (média)
<b>POSITIVO HPV</b> (n=22)	158,1	462,6
<b>NEGATIVO HPV</b> (n=52)	154,8	437,1

Foi analisado também o Índice de Correlação entre os resultados quantitativos da reação de hibridização e as variáveis estudadas ao Ki67. Para tanto, foi utilizada a Correlação Linear de Pearson (r), que procura quantificar o grau de relacionamento entre duas variáveis (Santos C, 2007). Os valores variam de 0 a +1, quando a relação entre os dados é diretamente proporcional, e de 0 a -1, quando inversamente proporcional (Anexo 3). O valor de *p* adotado para correlação significativa foi de 0,05.

Notou-se que a correlação é significativa e negativa, de fraca a moderada ( $r = -0,44$  e  $-0,48$ , respectivamente), tanto entre o número absoluto de núcleos HPV positivos como da porcentagem do sinal difuso na HIS no terço superficial do epitélio em relação à densidade de núcleos Ki67 positivos/mm<sup>2</sup>, ao número de triângulos formados entre os núcleos e ao número de vértices do MST. Assim, em outras palavras, quanto maior a quantidade de núcleos HPV positivos e difusos nas camadas superficiais do epitélio, menor é a densidade nuclear do Ki67 no epitélio, e o contrário também verdadeiro (Tabela 11).

**Tabela 11-** Valores da Correlação de Pearson (r) entre o número absoluto de núcleos positivos e o percentual de núcleos com marcação difusa na HIS e a densidade de núcleos/mm<sup>2</sup>, número de triângulos e de vértices formados na triangulação realizada pelo programa “Sociology”, com o Ki67.

	<b>Densidade/mm<sup>2</sup></b> (valor de r)	<b>Número de Triângulos</b> (valor de r)	<b>Número de Vértices</b> (valor de r)
<b>Nº absoluto de núcleos HPV+</b> (terço superficial)	-0,44	-0,44	-0,44
<b>Percentual de núcleos difusos na HIS</b> (terço superficial)	-0,47	-0,48	-0,48
<b>Valor de p</b>	0,03	0,02	0,02

## **6- DISCUSSÃO**

---

## 6.1- Hibridização *in situ*

O papel do Papilomavírus humano na carcinogênese cervical é amplamente reconhecido e o vírus é detectado em praticamente todas as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas cervicais (Walboomers JM et al, 1999 *apud* 11). Há evidências epidemiológicas de que a infecção persistente, alta carga viral e a integração dos tipos oncogênicos do HPV ao genoma da célula hospedeira têm papel preponderante no desenvolvimento do carcinoma epidermóide do colo uterino (59).

A principal característica da integração é provavelmente a estabilização das oncoproteínas virais E6 e E7, que interagem com o ciclo celular, através da degradação das proteínas p53 e do retinoblastoma (4,60).

Diversos estudos evidenciaram que a maioria das lesões de NIC1 (até 80%) está associada à infecção por HPV de alto risco de oncogênico (61). O DNA do HPV apresenta-se integrado na maioria das NIC de alto grau e no carcinoma, mas encontra-se geralmente em sua forma epissomal nas NIC1 (21,27,29). Contudo, alguns estudos mostram integração viral em cerca de 50% das NIC1, sugerindo que este seria um evento precoce na carcinogênese (62).

Os critérios morfológicos são importantes para o diagnóstico de NIC, porém não permitem diferenciar entre as lesões de NIC1 que irão regredir ou persistir, e aquelas com potencial para progressão. São necessários, assim, marcadores que possam antever o comportamento da lesão (59).

A integração viral pode ser detectada utilizando a hibridização *in situ* e é descrito na literatura que sinais de expressão difusa representam a forma não integrada do vírus (epissomal), enquanto o padrão puntiforme, indicaria sua forma integrada (21). O método da HIS é, em geral, de baixa sensibilidade, porque é necessário um alto número de cópias virais para ocorrer a positividade da reação. Contudo, a utilização do método de amplificação pela tiramida levou a grande

aumento de sensibilidade e alguns estudos evidenciaram marcação positiva com a detecção de uma única cópia do vírus (26,30,63). Evans et al, 2004 (32) relataram sinal puntiforme em 100% das NICs, mas também observaram este padrão em lesões relacionadas a HPV de baixo risco. Omori et al, 2007 (15) evidenciaram positividade em 28% nas NIC1, alguns destes casos com sinais difuso e puntiforme. A integração parece ser um evento chave na transição de NIC1 para NIC2-3 e carcinoma.

Foram analisadas 74 biópsias de NIC1 e 22 delas (30%) foram positivas, demonstrando a presença do HPV de alto risco pela HIS em 30% dos casos, como descrito na literatura. Mesmo assim, dos 74 casos, 26 (35%) progrediram para NIC2-3 no seguimento. É importante notar que dos 26 casos, apenas 8 foram positivos para HIS, mesmo com o método de amplificação da tiramida. Os resultados deste estudo, portanto, são baseados em um relativo pequeno número de casos positivos à HIS.

Foi definido neste trabalho que as pacientes com laudo de NIC2-3 no segundo procedimento seriam consideradas como progressão da lesão pelo fato de apresentarem diagnóstico prévio, citológico e histológico, de NIC1. Se alguma destas mulheres na verdade já tivesse NIC de alto grau, não detectada na biópsia, é difícil ou impossível de se confirmar.

Não foi observada diferença de comportamento entre os casos positivos e negativos pela HIS, o que difere do estudo de Song SH et al, 2006 (14), que verificaram que os casos positivos para o HPV mostraram evolução pior do que aqueles negativos.

Todos os 22 casos positivos mostraram marcação difusa e puntiforme nas camadas superficial e intermédia, porém, o número de núcleos puntiformes foi 3,5 vezes maior no grupo com progressão. Apesar dessa maior frequência, pela análise estatística esta diferença não foi significativa, o que pode ser atribuído ao relativo pequeno número de casos positivos na nossa amostra. Guo M et al, 2008 (60), notaram que, dentre os casos de NIC1 positivos pela HIS,

50% mostraram sinais puntiformes e difusos e 39% apenas marcação puntiforme. Estes mesmos autores observaram que as pacientes com a forma exclusiva puntiforme na hibridização mostraram pior evolução.

Uma diferença significativa encontrada entre os grupos estudados foi a alta porcentagem de núcleos puntiformes nas porções basais do epitélio nos casos que progrediram. A literatura considera que o sinal puntiforme na camada basal é crítico para o desenvolvimento de lesão de alto grau (27,30). Por outro lado, cabe questionar se todo sinal puntiforme necessariamente representaria integração no método com tiramida (32). A maior sensibilidade deste método poderia aumentar o risco de uma coloração inespecífica lembrando o aspecto puntiforme (27,30,31). Este sistema também é capaz de detectar pequeno número de cópias virais, o que por sua vez poderia estar relacionado ao sinal puntiforme ou em “dot”. Pelos nossos resultados, observamos alta porcentagem de núcleos puntiformes nas camadas superficiais no grupo sem progressão, o que poderia ser interpretado como pequeno número de cópias virais na camada superficial e não como integração viral.

Desta forma, não seria apenas a presença do sinal puntiforme, mas a sua relativa localização no epitélio que falariam a favor da integração. Assim, a progressão se correlacionaria à presença de núcleos puntiformes somente na camada basal, indicando os casos de NIC1 que podem ter pior comportamento. A integração viral seria, assim, um evento precoce na neoplasia cervical (64). Evans MF et al, 2002 (26) e Kalof AN, 2005 (27), também observaram núcleos puntiformes nas lesões de NIC1, porém apenas a marcação basal se correlacionou à evolução da lesão, concordando com os nossos resultados. Assim, um ponto importante verificado no nosso trabalho é que o padrão puntiforme, como sinal de integração viral, deve ser interpretado cuidadosamente nas diferentes porções do epitélio.

Cooper et al, 2003 (12), observaram que a integração do HPV de alto risco nas NIC1 é rara. Propuseram que este evento desregularia a capacidade viral em gerar epissomos, essencial para a propagação viral. A integração

ocorreria nas células basais, provocando uma expressão inadequada dos genes virais E6 e E7, o que permitiria que as células epiteliais mantivessem sua capacidade de replicação, não sendo esta confinada à camada basal do epitélio. Como conseqüência, ocorreria a proliferação celular contínua e sua imortalização, com a evolução para NIC2-3 e carcinoma (12). Outros autores, como Gallo G, 2003 (62) e Kulmala SMA, 2006 (28), também confirmaram a presença da forma integrada do vírus em casos de NIC1.

Pelos nossos resultados, a progressão da lesão se associou à idade das pacientes. Este fato está em concordância com diversos autores que constataram integração do vírus principalmente em mulheres mais velhas (15,26,28,65), o que é consistente com a seleção dos clones integrados na história natural das NIC (64).

Até o momento, nenhum trabalho relacionado à hibridização *in situ* para HPV havia realizado uma avaliação quantitativa dos núcleos marcados nas diferentes porções do epitélio. Com esta nossa abordagem quanto à distribuição da marcação nas porções epiteliais basal, intermédia e superficial em relação ao comportamento das NIC, pretendemos dar prosseguimento a novos estudos, com maior número de casos, referentes ao comportamento das lesões precursoras do câncer cervical.

Em conclusão, a técnica da HIS com amplificação pela tiramida é adequada para uso na rotina, visto que é empregada em material parafinado e há preservação da morfologia. Destacamos que é importante valorizar que a HIS pode ser utilizada no estudo da evolução das NIC, porém sua interpretação deve ser cuidadosa, especialmente em relação ao padrão puntiforme, que pode ter diferente significado, dependendo da região do epitélio avaliada. A detecção do padrão puntiforme nas camadas basais pode sinalizar um pior prognóstico, com implicações no seguimento mais adequado e tratamento destas lesões.

## 6.2- Expressão do Ki67

O uso do Ki67 como método auxiliar no diagnóstico das NIC está bastante estabelecido na literatura (33,56). O epitélio cervical normal exhibe essencialmente positividade nas camadas basal e para-basal, enquanto que a posição dos núcleos marcados no epitélio será mais alta quanto maior o grau da neoplasia intraepitelial (36). Pirog EC et al, 2002 (35) e Kruse AJ et al, 2002 (38), estudaram a importância deste marcador na diferenciação entre lesões benignas e displásicas, verificando que nas NIC são observados núcleos positivos para Ki67 em aglomerados nas camadas superiores do epitélio.

Poucos estudos, contudo, têm avaliado a utilidade deste marcador como adjuvante no comportamento das neoplasias intraepiteliais. Baak JAP, 2005b (54) e Kruse AJ et al, 2003 (58), 2004-b e c (50,51), observaram diferenças de expressão em casos com e sem progressão.

Pela nossa análise morfológica quantitativa através do programa "Sociology", foi observado que a densidade de núcleos positivos ao Ki67 nos casos que regrediram era significativamente menor que aquela dos casos que permaneceram como NIC1 ou progrediram. Isto concorda indiretamente com os trabalhos de Kruse AJ et al (51,58), onde os casos que progrediram mostraram maior densidade de núcleos. Estes autores notaram ainda que os casos que progrediram apresentavam índice de estratificação mais elevado e núcleos positivos no terço médio do epitélio mais freqüentes. Entretanto, nestes mesmos estudos, foram avaliados casos de NIC1 e NIC2 em conjunto, com apenas 2 casos de NIC1 com progressão. Os resultados, assim, podem ter sofrido interferências com a maior casuística de NIC2, visto que é esperado que estas lesões mostrem núcleos em estratos epiteliais mais elevados e maior densidade nuclear, o que já havia sido verificado por Dellas A et al, 1996 (66) e Isacson C et al, 1996 (37).

A espessura do epitélio na NIC, assim como o Índice de Estratificação e a porcentagem de células positivas para Ki67 no terço médio do epitélio têm sido destacados como possíveis marcadores de progressão. Nos casos aqui

estudados, não se observou diferença significativa destas medidas entre os grupos com diferente evolução. Isto poderia ser explicado pelo encontro de alguns núcleos isolados em camadas mais altas do epitélio, que interferem nos valores do índice de estratificação e também na análise quantitativa das outras medidas. Baak JPA, 2006 (39) e Kruse AJ, 2003 (58) e 2004c (51), verificaram que casos que progrediram exibiram altos valores do IE, maior número de núcleos marcados no terço médio, além de menor espessura epitelial. Deve-se ressaltar que são poucos os trabalhos na literatura que fazem este tipo de medida quantitativa e, a comparação dos nossos resultados com os estudos de Kruse et al, 2004c (51), não é totalmente correspondente, visto que eles avaliaram a progressão de um conjunto de casos de NIC1 e NIC2, onde predominavam as NIC2, como já comentado.

Pela análise morfológica quantitativa, o programa mostrou que o grupo com regressão apresentou uma distribuição nuclear diferente dos outros dois grupos. Foi constatado um arranjo nuclear mais compacto, com maior número de vizinhos e menores distâncias entre o núcleo vizinho mais próximo nos casos que progrediram ou mantiveram NIC1. Isto pode ser explicado pela maior densidade nuclear nestes dois grupos, pela menor quantidade de citoplasma destas células, ou por ambos. Mesmo não avaliando o comportamento das NIC em seu trabalho, Kruse AJ et al, 2004a (45), observaram menor distância entre os núcleos nas lesões de NIC3, em comparação às NIC1 e 2, associando o resultado à grande quantidade de células basalóides em toda a espessura epitelial nas NIC3, e à maior densidade nuclear nestes casos.

Pela análise quantitativa, as características do grupo com regressão das lesões são diferentes e se destacam dos outros 2 grupos. Porém, os valores encontrados para os grupos com manutenção do diagnóstico de NIC1 ou com progressão da lesão foram muito semelhantes. Assim, não se verificou uma medida que fosse indicativa da progressão. Entretanto, a partir das características das lesões associadas à regressão, sinais indiretos da possibilidade de manutenção ou progressão da lesão são apontados pelo programa: maior densidade nuclear e menor distância entre os núcleos marcados.

Por outro lado, a simples avaliação subjetiva do Ki67 mostrou que a positividade em mais da metade do epitélio foi mais frequente nos casos que progrediram. Poderia ser questionado se as lesões com expressão de Ki67 em mais da metade do epitélio seriam classificadas como NIC1. A nossa classificação do epitélio atípico foi feita por dois observadores e obedeceu a critérios morfológicos estabelecidos. Apesar de estudar o Ki67 em neoplasias intraepiteliais vaginais, Logani S et al, 2003 (67), também notaram a presença de núcleos positivos nas camadas superiores do epitélio nas lesões de grau 1.

Esta simples avaliação do Ki67 pode apontar para as alterações na diferenciação epitelial, com a manutenção da proliferação celular em camadas mais altas do que as observadas no epitélio normal, promovidas pela infecção pelo HPV de alto risco oncogênico. Observou-se também que a grande maioria dos nossos casos positivos para HPV de alto risco oncogênico (73%) mostraram marcação para Ki67 em mais da metade da espessura epitelial (Tabela 9), resultado este apoiado pela literatura. Dellas A et al, 1996 (66) e Kruse AJ, 2001b (57), verificaram maior porcentagem de núcleos positivos para o Ki67 e também núcleos mais altos no epitélio em lesões associadas ao HPV de alto risco. Além disso, todos os casos com sinal puntiforme na camada basal à reação de HIS (que se correlacionou com progressão da lesão) apresentavam positividade para o Ki67 em mais da metade da espessura epitelial.

Este é um dado muito interessante, porém, deve-se ressaltar que muitos NIC1 que não progrediram, expressaram Ki67 em mais da metade do epitélio. Portanto, o comportamento de um caso isolado de NIC1 não pode ser afirmado, mas a expressão do Ki67 poderá ser um indicador de maior probabilidade de progressão. Frente a este resultado, podemos comentar que o método da análise morfológica quantitativa pode ser mais preciso, porém é muito mais trabalhoso e não forneceu vantagens se comparado à simples leitura da reação do Ki67 em diferentes níveis do epitélio.

Ao se comparar a análise morfológica quantitativa do Ki67 com os dados da hibridização in situ, notou-se que os casos positivos para HPV de alto risco oncogênico apresentavam maior densidade de núcleos Ki67 positivos, o que está de acordo com Kruse et al, 2001b (57). Como não há estudos na literatura comparando uma análise quantitativa da HIS com Ki67, nossos dados apontam para a correlação entre a presença do HPV de alto risco oncogênico e a maior proliferação celular do epitélio, verificada pela maior densidade de núcleos Ki67 positivos. Esta correlação deve ser interpretada conforme os distintos aspectos encontrados. De um lado, os casos com expressão puntiforme na HIS na camada basal do epitélio foram associados à progressão da lesão, relacionados à integração viral ao genoma da célula e associados à expressão do Ki67 em mais da metade do epitélio. Por outro lado, uma correlação indireta foi observada entre o sinal difuso da HIS em camadas superficiais, correspondendo à forma episomal do HPV na lesão, e sua associação à menor densidade de expressão do Ki67 no epitélio.

## **7- CONCLUSÃO**

---

## 7.1- Idade

- A idade das pacientes foi maior no grupo com progressão das lesões.

## 7.2- Expressão do HPV de alto risco pela técnica da Hibridização *in situ* nas NIC1

- HPV de alto risco oncogênico foi evidenciado em 30% das NIC1;
- Não houve correlação entre a positividade para HPV de alto risco oncogênico pela HIS e o comportamento da lesão de NIC1;
- Nas lesões de NIC1, apenas a presença de núcleos com sinal puntiforme da reação no terço basal do epitélio se correlacionou com progressão para NIC 2-3;
- Os casos sem progressão da lesão mostraram maior concentração de núcleos positivos, de padrão difuso ou puntiforme, nas camadas mais superficiais do epitélio, enquanto que nos casos que progrediram, a distribuição de positividade nuclear foi mais uniforme, em todas as regiões do epitélio;
- A HIS pode ser utilizada no estudo da evolução das NIC, porém sua interpretação deve ser cuidadosa, especialmente em relação ao padrão puntiforme, que pode ter diferente significado, dependendo da região do epitélio avaliada. A detecção do padrão puntiforme nas camadas basais pode sinalizar progressão da lesão, com implicações no seguimento e tratamento mais adequados.

### **7.3- Expressão do Ki67 pela simples avaliação da reação**

- A expressão do Ki67 em mais da metade do epitélio foi associada ao grupo com progressão da lesão.

### **7.4- Expressão do Ki67 pela análise morfológica quantitativa**

- A densidade nuclear do Ki67 foi menor no grupo que regrediu em relação ao grupo que permaneceu como NIC 1 ou que progrediu;
- A distribuição espacial dos núcleos, verificada pelas relações de vizinhança, foi diferente nos casos que progrediram ou que mantiveram o NIC1, com arranjo nuclear mais compacto do que o grupo que regrediu;
- Não foram encontradas diferenças na espessura do epitélio e nem na altura dos núcleos positivos no epitélio (Índice de Estratificação) entre os três grupos;
- A análise morfológica quantitativa pode ser uma ferramenta útil na avaliação do comportamento das NIC, em especial para as lesões em regressão, porém é muito laboriosa e pode ser substituída pela simples avaliação subjetiva da expressão do Ki67 em diferentes níveis do epitélio.

### **7.5- Comparação dos dados da HIS com a análise do Ki67**

- Houve correlação entre a presença do HPV de alto risco oncogênico e a maior proliferação celular do epitélio, verificada pela maior densidade de núcleos Ki67 positivos/ mm<sup>2</sup>;
- Casos positivos para HPV de alto risco oncogênico à HIS expressaram Ki67 em estratos mais altos do epitélio;

- a expressão puntiforme na HIS na camada basal do epitélio, foi associada à progressão da lesão e à expressão do Ki67 em mais da metade do epitélio;
- a maior quantidade de núcleos positivos e com sinal difuso à HIS no terço superficial do epitélio mostrou relação inversa com a densidade de núcleos positivos para Ki67;
- a associação dos dois métodos pode apontar aspectos sugestivos de progressão da lesão de NIC1;

## **8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- 1- Crum CP, Lee KR. Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology. In: Cervical Squamous Neoplasia. Elsevier Inc; 2006.
- 2- Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Lin YS, Fu E, Gau CH. Is p16<sup>INK4a</sup> expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 2005; 97:35-40.
- 3- Kurman RJ. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. In: Precancerous Lesions of the Cervix. New York: Springer-Verlag; 2001.
- 4- Kalof AN, Cooper K. Our approach to squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 2007; 60:449-455.
- 5- Mount SL, Evans MF, Wong C, Cooper K. Human papillomavirus-induced lesions of the cervix. A review and update on the grading of cervical dysplasia. *Pathology Case Reviews* 2003; 8(4): 145-151.
- 6- Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003.
- 7- Wang SS, Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 35-40.
- 8- Cox JT. The development of cervical cancer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18(suppl 1):S5-S13.
- 9- Steben M, Duarte-Franco E. Human Papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol* 2007; 107:S2-S5.

- 10- Moodley M. Update on pathophysiologic mechanisms of human papillomavirus. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17:61-64.
- 11- Kalof AN, Cooper K. p16<sup>INK4a</sup> immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol* 2006; 13(4): 190-194.
- 12- Cooper K, Evans M, Mount S. Biology and evolution of cervical squamous intraepithelial lesions: a hypothesis with diagnostic prognostic implications. *Adv Anat Pathol* 2003; 10:200-3.
- 13- Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998; 51:96-103.
- 14- Song SH, Lee JK, OH MJ, Hur JY, Park YK, Saw HS. Risk factors for the progression or persistence of untreated mild displasia of uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:1608-1613.
- 15- Omori M, Hashi A, Nakazawa K, et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16<sup>INK4a</sup> immunoexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol* 2007;128:208-17.
- 16- Nappi L, Carriero C, Bettocchi S, Herrero J, Vimercati A, Putignano G. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and untreated women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 121:226-232.
- 17- De Marco L, Gillio-Tos A, Bonello L, Ghisetti V, Ronco G, Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DPIS-PCR and sequencing. *J Clin Virol* 2007; 38:7-13.
- 18- Hariri J, Oster A. The negative predictive value of p16<sup>INK4a</sup> to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26:223-228.

- 19- Crum CP. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. *Mod Pathol* 2000; 13(3):243-251.
- 20- Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 2007; 212:356-67.
- 21- Cooper K, Herrington CS, Stickland JE, Evans MF, McGee JOD. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic *in situ* hybridisation. *J Clin Pathol* 1991; 44:990-96.
- 22- Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, Mian C, Egarter-Vigl E. p16<sup>INK4a</sup> expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004; 445:616-620.
- 23- Sano T, Hikino T, Niwa Y, et al. *In situ* hybridization with biotinylated tyramide amplification: detection of human papillomavirus DNA in cervical neoplastic lesions. *Mod Pathol* 1998; 11(1);19-23.
- 24- Unger ER, Vernon SD, Lee DR, Miller DL, Reeves WC. Detection of human papillomavirus in archival tissues: comparison of *In Situ* Hybridization and Polymerase Chain Reaction. *J Histochem Cytochem* 1998; 46(4):535-540.
- 25- Fujii T, Masumoto N, Saito M et al. Comparison between *in situ* hybridization and Real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diag Mol Pathol* 2005; 14(2):103-108.
- 26- Evans MF, Mount SL, Beatty BG, Cooper K. Biotinyl-tyramide-based *in situ* hybridization signal patterns distinguish human papillomavirus type and grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 2002; 15(12):1339-47.
- 27- Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16<sup>INK4a</sup> immunoexpression and HPV *in situ* hybridization signal patterns. Potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:674-679.

- 28- Kulmala S-MA, Syrjanen SM, Gyllenten UB, et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol* 2006; 59:513-17.
- 29- Bryan JT, Taddeo F, Skulsky DM, et al. Detection of specific human papillomavirus types in paraffin-embedded sections of cervical carcinomas. *J Med Virol* 2006; 78:117-24.
- 30- Lizard G, Démares-Poulet M-J, Roignot P, Gambert P. In situ hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells, using a catalyzed signal amplification system: GenPoint™. *Diagn Cytopathol* 2001; 24(2):112-115.
- 31- Evans MF, Aliesky HA, Cooper K. Optimization of biotinyl-tyramide-based *in situ* hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Clin Pathol* 2003; 3(1):2.
- 32- Evans MF, Cooper K. Human papillomavirus integration: detection by *in situ* hybridization and potential clinical application. *J Pathol* 2004; 202:1-4.
- 33- Bulten J, Van der Laak JAWM, Gemmink JH, et al. MIB1, a promising marker for the classification of cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 1996; 178: 268-273.
- 34- Wang JL, Zheng BY, Li XD, et al. Predictive significance of the alterations of p16<sup>INK4a</sup>, p14<sup>ARF</sup>, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2407-2414.
- 35- Pirog EC, Baergen RN, Soslow RA, et al. Diagnostic accuracy of cervical low-grade squamous intraepithelial lesions is improved with MIB-1 immunostaining. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(1):70-75.
- 36- Carreras R, Alameda F, Mancebo G, et al. A study of Ki-67, c-erbB2 and cyclin D-1 expression in CIN-I, CIN-III and squamous cell carcinoma of the cervix. *Histol Histopathol* 2007; 22: 587-592.

- 37- Isacson C, Kessis TD, Hedrick L, Cho KR. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with papillomavirus type. *Cancer Res* 1996; 56:669-674.
- 38- Kruse AJ, Baak JPA, Helliesen T, et al. Evaluation of MIB-1 positive cell clusters as a diagnostic marker for cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(11): 1501-1507.
- 39- Baak JPA, Kruse AJ, Robboy SJ, Janssen E, Diermen B, Skaland I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol* 2006; 59: 1017-1028.
- 40- Keenan SJ, Diamond J, McCluggage G, et al. An automated machine vision system for the histological grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *J Pathol* 2000; 192:351-362.
- 41- Sudbo J, Brankfalvi A, Bryne M, et al. Prognostic value of graph theory-based tissue architecture analysis in carcinomas of the tongue. *Lab Invest* 2000; 80:1881-1889.
- 42- Haroske G, Dimmer V, Steindorf D, et al. Cellular Sociology of proliferating tumor cells in invasive ductal breast cancer. *Analyt Quant Cytol Histol* 1996; 18:191-198.
- 43- Palmer JE, Sant Cassia LJ, Irwin CJ, et al. The prognostic and predictive value of Syntactic Structure Analysis in serous carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27:191-198.
- 44- The Euclidean Minimum Spanning Tree Aplicada [database na Internet], 2007 [acesso em outubro de 2009]. Disponível em URL: [www.absoluteastronomy.com/topics](http://www.absoluteastronomy.com/topics)
- 45- Kruse AJ, Buhr-Wildhagen S, Janssen EA, Baak JPA. The relationship between syntactic structure analysis features, histological grade and high-risk HPV DNA in cervical intraepithelial neoplasia. *Cell Oncol* 2004a; 26:135-141.

- 46- Scarpelli KC. Variáveis derivadas da Análise da Estrutura Sintática e dados clínicos como fatores preditivos em Tumor Venéreo Transmissível Canino com terapia de vincristina [Tese de Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2008.
- 47- Ferreras, J. Departamento de Matemática Aplicada [database na Internet], 2000 [acesso em outubro de 2009]. Disponível em URL: [www.dma.fi.upm.es/.../DiagramaDeVoronoi.html](http://www.dma.fi.upm.es/.../DiagramaDeVoronoi.html)
- 48- Diagrama de Voronoi [database na Internet], 2008 [acesso em outubro de 2009]. Disponível em URL: <http://www.comp.lancs.ac.uk/~kristof/research/notes/voronoi>
- 49- Guillaud M, Cox D, Malpica A, et al. Quantitative histopathological analysis of cervical intra-epithelial neoplasia sections: methodological issues. *Cell Oncol* 2004; 26:31-43.
- 50- Kruse AJ, Gudlaugsson E, Helliesen T, et al. Evaluation of prospective, routine application of Ki-67 immunoquantification in early CIN for assessment of short-term progression risk. *Anal Quant Cytol Histol* 2004b; 26: 134-140.
- 51- Kruse AJ, Skaland I, Janssen EA, et al. Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. *Int J Gynecol Pathol* 2004c; 23: 100-109.
- 52- Kruse AJ, Baak JPA, Janssen EA, et al. Ki-67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cell Oncol* 2004d; 26: 13-20.
- 53- Baak JPA, Kruse AJ, Janssen E, Diermen B. Predictive testing of early CIN behaviour by molecular biomarkers. *Cell Oncol* 2005a; 27:227-280.

- 54- Baak JPA, Kruse AJ. Use of biomarkers in the evaluation of CIN grade and progression of early CIN. *Methods Mol Med* 2005b; 119: 85-99.
- 55- Avoort IAM, Laak JAWM, Paffen A, et al. MIB-1 expression in basal cell layer: a diagnostic tool to identify premalignancies of the vulva. *Mod Pathol* 2007; 20:770-778.
- 56- Kruse AJ, Baak JPA, Bruin PC, et al. Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol* 2001a; 193:48-54.
- 57- Kruse AJ, Baak JPA, Bruin PC, et al. Relationship between the presence of oncogenic HPV DNA assessed by polymerase chain reaction and Ki-67 immunoquantitative features in cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 2001b; 195: 557-562.
- 58- Kruse AJ, Baak JPA, Janssen EA, et al. Low and high-risk CIN 1 and CIN 2 lesions: prospective predictive value of grade, HPV, and Ki-67 immuno-quantitative variables. *J Pathol* 2003; 199:462-470.
- 59- Queiroz C, Silva TC, Alves VAF, et al. p16<sup>INK4a</sup> expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract* 2006; 202:77-83.
- 60- Guo M, Gong Y, Deavers M, Silva EG et al. Evaluation of a commercialized in situ hybridization assay for detecting HPV DNA in tissue specimens from patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *J Clin Microbiology* 2008; 46: 274-80.
- 61- ALTS Group. Human Papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92:397-402.

- 62- Gallo G, Bibbo M, Bagella L et al. Study of viral integration of HPV 16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol* 2003; 56: 532-36.
- 63- Plummer TB, Sperry AC, Xu HS, Lloyd RV. In situ hybridization detection of low copy nucleic acid sequences using catalyzed reporter deposition and its usefulness in clinical human papillomavirus typing. *Diagn Mol Pathol* 1998; 7: 76-84.
- 64- Evans MF, Adamson CSC, Cooper K. Evidence of HPV16 integration in low- and high-grade cervical lesions that regress demonstrated by multiple displacement amplification and Southern blot hybridisation. *J Clin Pathol* 2008; 61: 541-43.
- 65- Schiller CL, Nickolov AG, Kaul KL, et al. High-risk human papillomavirus detection: a split-sample comparison of hybrid capture and chromogenic *in situ* hybridization. *Am J Clin Pathol* 2004; 121:537-545.
- 66- Dellas A, Schultheiss E, Almendral AC, Torhorst J, Gudat F. Assessment of EGFR and TGF- $\alpha$  expression in relationship to HPV status and Ki-67 distribution in cervical intraepithelial neoplasms. *Int J Cancer* 1996; 69: 165-169.
- 67- Logani S, Lu D, Quint WGV, Ellenson LH, Pirog EC. Low-grade vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia: correlation of histologic features with Human Papillomavirus DNA detection and Mib-1 immunostaining. *Mod Pathol* 2003; 16:735-741.
- 68- Santos C. *Estatística Descritiva - Manual de Auto-aprendizagem*. Lisboa: Edições Silabo; 2007. 264p.

## **9-ANEXOS**

---

Casos estudados pela HIS, idade das pacientes e número de núcleos positivos  
segundo o padrão de reação em cada região do epitélio

Biópsia	idade	Diagn final	1/3 basal		1/3 interm		1/3 superf	
			D	P	D	P	D	P
439-04	24	0	0	0	0	0	0	0
6502-05	21	0	0	0	0	0	0	0
1172-04	25	0	0	0	0	0	0	0
poli 113	19	0	0	0	0	0	0	0
poli 199	22	0	0	0	0	0	0	0
poli 236	17	0	0	0	0	0	0	0
poli 178	22	0	0	0	0	0	0	0
poli 182	43	0	0	0	0	0	0	0
poli 207	19	0	0	0	0	0	0	0
<b>poli 156</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	<b>26</b>
poli 137	30	0	0	0	0	0	0	0
5133-05	59	0	0	0	0	0	0	0
10907-03	72	0	0	0	0	0	0	0
<b>2535-04</b>	<b>29</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>38</b>	<b>133</b>	<b>37</b>
2280-04	26	0	0	0	0	0	0	0
poli 87	22	0	0	0	0	0	0	0
1162-05	23	0	0	0	0	0	0	0
<b>1169-05</b>	<b>23</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>84</b>	<b>54</b>	<b>150</b>	<b>18</b>
8374-05	36	0	0	0	0	0	0	0
751-04	20	1	0	0	0	0	0	0
1413-04	35	1	0	0	0	0	0	0
1715-05	19	1	0	0	0	0	0	0
2172-04	23	1	0	0	0	0	0	0

<b>3072-04</b>	<b>25</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>24</b>	<b>55</b>	<b>24</b>
4070-04	18	1	0	0	0	0	0	0
<b>4285-04</b>	<b>20</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>18</b>	<b>12</b>
4370-04	32	1	0	0	0	0	0	0
5096-01	35	1	0	0	0	0	0	0
5688-04	30	1	0	0	0	0	0	0
<b>5997-04</b>	<b>28</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
6010-04	17	1	0	0	0	0	0	0
<b>7291-04</b>	<b>26</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>19</b>
<b>7537-05</b>	<b>22</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
8342-03	31	1	0	0	0	0	0	0
8375-05	18	1	0	0	0	0	0	0
<b>9493-04</b>	<b>24</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>22</b>	<b>0</b>	<b>30</b>
11711-03	20	1	0	0	0	0	0	0
<b>12478-05</b>	<b>17</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>24</b>	<b>7</b>
poli 63	19	1	0	0	0	0	0	0
poli 84	20	1	0	0	0	0	0	0
<b>poli 106</b>	<b>26</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>8</b>	<b>23</b>
<b>poli 148</b>	<b>38</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>11</b>
<b>poli 153</b>	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>14</b>	<b>15</b>
<b>poli 166</b>	<b>41</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>18</b>
poli 174	19	1	0	0	0	0	0	0
poli 221	20	1	0	0	0	0	0	0
poli 222	43	1	0	0	0	0	0	0
poli 237	20	1	0	0	0	0	0	0
572-04	21	2	0	0	0	0	0	0
791-05	47	2	0	0	0	0	0	0

959-04	24	2	0	0	0	0	0	0
970-04	21	2	0	0	0	0	0	0
1339-04	65	2	0	0	0	0	0	0
2743-01	40	2	0	0	0	0	0	0
<b>2881-04</b>	<b>22</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
5819-04	16	2	0	0	0	0	0	0
6820-04	29	2	0	0	0	0	0	0
9202-04	26	2	0	0	0	0	0	0
<b>9678-03</b>	<b>30</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>31</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>4</b>
<b>10078-04</b>	<b>22</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>11841-03</b>	<b>24</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>12475-05</b>	<b>21</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
poli 69	25	2	0	0	0	0	0	0
poli 70	32	2	0	0	0	0	0	0
242-01	41	2	0	0	0	0	0	0
665-05	39	2	0	0	0	0	0	0
4383-05	22	2	0	0	0	0	0	0
<b>5467-04</b>	<b>61</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>29</b>	<b>28</b>	<b>23</b>	<b>42</b>
<b>6011-04</b>	<b>38</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>16</b>
7183-04	36	2	0	0	0	0	0	0
<b>8678-04</b>	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>20</b>	<b>13</b>
8845-05	34	2	0	0	0	0	0	0
9455-04	33	2	0	0	0	0	0	0
12517-01	30	2	0	0	0	0	0	0

Diagnóstico final: **0**= regressão; **1**= manteve NIC1; **2**= progrediu. **P**= marcação puntiforme; **D**= marcação difusa no núcleo.

Em negrito, casos positivos.

Médias de espessura epitelial, área da lesão, Índice de Estratificação e seu percentil 90 nos grupos estudados

<b>Grupos</b>	<b>Espessura epitelial (m<math>\mu</math>)</b>	<b>Área da Lesão (<math>\mu^2</math>)</b>	<b>Índice de Estratificação (IE)</b>	<b>Percentil 90 do IE (%)</b>
<b>Regressão (n=19)</b>	1297,11	508,55	0,394	82,19
<b>Manteve NIC1 (n=29)</b>	1509,01	569,49	0,393	83,51
<b>Progressão (n=26)</b>	1513,59	574,87	0,417	85,06
<b>Valores de p</b>	0,09	0,69	0,26	0,12

## Interpretação dos valores da Correlação Linear de Pearson

(fonte: Santos C, 2007).

<b>Valor de r</b>	<b>Correlação</b>
$r = +1$	Perfeita positiva
+0,8 a +1	Forte positiva
+0,5 a +0,8	Moderada positiva
+0,1 a +0,5	Fraca positiva
0 a +0,1	Ínfima positiva
$r = 0$	Nula
-0,1 a 0	Ínfima negativa
-0,1 a -0,5	Fraca negativa
-0,5 a -0,8	Moderada negativa
-0,8 a -1,0	Forte negativa
$r = -1$	Perfeita negativa