

Caracterização morfométrica das lesões do colo uterino relacionadas ao vírus da papilomatose humana

Carlos Roberto de Resende Miranda¹, Liane Deligdisch², Joan Gil³, Peter R. Dottino⁴, Carmel J. Cohen⁵

Resumo

Este estudo é voltado para os seguintes aspectos ligados às lesões cervicais relacionadas ao Vírus da Papilomatose Humana (VPH): 1) identificação do vírus em tecido histologicamente normal; 2) diferenciação morfométrica das alterações induzidas pelo subtipo do VPH em condilomas, e 3) as diferenças morfométricas entre condiloma puro e Neoplasia Cervical Intraepitelial do Grau I (NIC I).

Usamos o índice morfométrico núcleo/citoplasmático para as medidas da área, perímetro e máximo diâmetro, da célula e do núcleo celular. Quarenta e oito lâminas de biópsias cervicais foram estudadas e os achados, classificados dentro de três grupos: normal (22 casos), condiloma (20 casos) e NIC I (6 casos).

A presença do DNA do VPH, detectada usando-se a metodologia da hibridização *in situ*, foi usada para estudar se o tecido histologicamente normal seria reconhecido como sendo infectado pelo VPH. Os casos de condiloma foram então comparados por meio de análise morfométrica para o subtipo do DNA do VPH por hibridização *in situ*, a fim de diferenciar os subtipos de VPH de baixo e alto risco.

Os parâmetros foram avaliados por análise multivariada e demonstraram classificar corretamente todos os casos, exceto dois, com uma probabilidade posterior bastante elevada.

Concluimos que os dados morfométricos foram úteis no diagnóstico diferencial entre as lesões cervicais relacionadas ao VPH.

Unitermos: morfometria; análise de imagens; displasia cervical; neoplasias cervicais; vírus da papilomatose humana; neoplasias genitais femininas; condições pré-cancerosas.

Introdução

O condiloma é uma doença sexualmente transmissível, causada pelo Vírus da Papilomatose Humana (VPH). Recentes informações epidemiológicas, clínicas e de biologia molecular (técnica de hibridização do DNA) correlacionaram o VPH à displasia e ao câncer cervical⁽¹⁾.

Os subtipos do VPH 6 e 11 são conhecidos por causarem verrugas ou condilomas, perineal, vulvar, vaginal e cervicais. De grande significado é que os subtipos 16, 18, 31, 33, 35 e 51, que também

causam verrugas e condilomas, têm sido identificados por técnicas de hibridização do DNA, no DNA de células de tecido diplástico e carcinoma cervical^(2,3).

Nosso estudo investiga os seguintes problemas: 1) estudos comparativos do *status* do HPV em tecidos de epitélio cervical normal, condilomas e em Neoplasia Intraepitelial Cervical do Grau I (NIC I), por hibridização *in situ* e por estudo morfométrico dos perfis dos núcleos e membrana citoplasmática das células da camada intermediária do epitélio

¹Visiting associate, Department of Pathology, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY. Professor Assistente, Departamento de Ginecologia e Obstetria, Universidade de Brasília, DF.

²Professor, Department of Pathology and Department of Obstetrics and Gynecology, Director of Gynecology Pathology Division, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY.

³Professor, Department of Pathology, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY.

⁴Associate Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science. Associate Director, Division of Gynecology Oncology, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY.

Professor and Acting Chairman, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science. Director, Division of Gynecology Oncology, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY.

Endereço para correspondência: Dr. Carlos Miranda, Caixa Postal 4600 – 70919-970 – Brasília – DF.

cervical; 2) alterações morfométricas em tecido histologicamente normal, com e sem infecção por VPH; 3) diferenças no índice núcleo/citoplasmático morfométrico em epitélio cervical infectado por subtipos de VPH de alto e baixo risco para câncer cervical.

Temos mostrado repetidas vezes que dados singulares provenientes de imagens planas das características nucleares, em particular, distribuição por tamanho de área, são característica de numerosos tumores, e podem ser usados em esquemas classificatórios estatísticos⁽⁴⁻⁶⁾.

Material e métodos

Estudamos lâminas de 48 biópsias cervicais guiadas colposcopicamente, por meio de análise computadorizada de imagens microscópicas ou simplesmente, morfometria.

Todos os casos estudados eram provenientes de pacientes da clínica de colposcopia do Mount Sinai Hospital que tinham sido previamente diagnosticadas com um raspado cervico-vaginal citologicamente compatível com condiloma ou displasia.

Os espécimes foram fixados em álcool, incluídos em parafina, cortados com micrótomo em fatias de 6 μ m, montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina.

Todas as lâminas foram previamente testadas por meio de hibridização *in situ* para a presença e subtipo do DNA do VPH, usando-se sondas biotiniladas, para os subtipos 6/11; 16/18 e 31/33/35/51, como previamente descrito⁽⁷⁾.

Cada lâmina foi revisada por no mínimo dois patologistas que concordaram na classificação histológica como tecido normal, condiloma ou NIC I.

Os critérios por nós usados para o diagnóstico histológico foram presença de coilocitose, células atípicas com halo perinuclear mais aumento nuclear e contorno irregular, disqueratose ou ceratinização de células individualmente e bi ou multinucleação, principalmente nas células das camadas superficiais e intermediárias.

Os critérios para se definir NIC foram: perda da maturação celular, perda da polaridade epitelial, índice núcleo/citoplasmático, presença de nucléolos proeminentes, agrupamentos cromatínico e figuras de mitose normais e anormais. NIC I corresponde ao achado de células displásticas confinadas ao terço inferior do epitélio.

Realizamos nossos estudos morfométricos em células da camada intermediária, a qual foi definida aqui como a camada que compreende as células que se posicionam entre as três fileiras de células

imediatamente sobre a membrana basal e as três fileiras de células superficiais.

Citologicamente, as células foram maiores do que aquelas da camada basal, com desmossomas visíveis e poucos vacúolos. Os núcleos eram picnóticos como na camada superficial e seus eixos eram horizontais, enquanto nas células basais, ele era mais perpendicular à membrana basal.

Células queratinizadas, displásticas e coilocíticas não foram incluídas.

Classificação

Foram realizados três estudos morfométricos: a) 48 casos previamente classificados em três grupos: 1) normal (22 casos), 2) condiloma (20 casos) e 3) NIC I (6 casos); b) casos histologicamente normais de *status* por hibridização *in situ* conhecido, para VPH/DNA tanto positivo (11 casos) como negativo (11 casos); c) condilomas (todos VPH/DNA positivos) classificados por hibridização *in situ* dentro dos subtipos do VPH/DNA encontrados, tanto de baixo (subtipos 6 e 11), como de alto risco (subtipos 16, 18, 31, 33, 35, e 51) para câncer do colo uterino, de acordo com o Sistema de Bethesda para classificação citológica.

Equipamento e procedimentos informatizados

Neste estudo nós usamos um sistema próprio e original de análise de imagens, construído ao redor de um microcomputador expandido multi bus Intel-310/7, baseado sobre um microprocessador 80286, correndo em 16 bit e um co-processador matemático 287 (Intel, Phoenix, AZ), com placas adicionais para processamento de imagens (Imaging Technology, Woburn, MA), particularmente o processador analógico AP-512 e frame buffers FP-512.

A imagem é gerada por uma câmera colorida Sony, instalada em cima de um microscópio óptico (Nikon).

A propósito de qualidade, a imagem é vista em um monitor colorido de alta resolução. O periférico interativo é uma tela sensível ao toque colocada sobre uma outra tela de vídeo de 13 polegadas.

O processamento das imagens é monocromático.

O usuário faz os traçados sobre a tela sensível ao toque imediatamente sobre uma figura em tempo real da célula de interesse, o restante do processamento é automático. O sistema funciona por meio de um sistema operacional de disco MS-DOS da Microsoft e é programado tanto em FORTRAN 77 ou C.

Levamos a termo nossos estudos usando um programa por nós desenvolvido que denominamos PPROFILE. Com este programa, traçávamos consecutivamente os perfis do núcleo e do citoplasma de 50 células da camada intermediária do tecido cervical escamoso. Ambos os perfis eram gravados e processados aos pares, assim o índice nuclear/citoplasmático de cada célula individual poderia ser computado. Os aumentos microscópicos utilizados foram de 100x, usando-se objetiva de imersão em óleo.

A computação dos valores da área, perímetro e diâmetro máximo de cada célula era dada em μm e o índice núcleo/citoplasmático da área, perímetro e diâmetro máximo para cada célula era automaticamente calculado pelo sistema.

Embora a média e o desvio padrão de cada variável fossem computados para cada caso, a análise multivariada se baseia nas entradas de cada valor individualmente, para cada célula estudada e para cada caso estudado. Usamos um pacote estatístico comercial chamado IMSL (Houston, TX).

É de se verificar que o propósito da análise multivariada não é classificar os casos (isto já é feito pelo patologista treinado), mas verificar se os grupos estudados são internamente homogêneos e reconhecíveis em termos de variáveis usadas sem o benefício do conhecimento humano.

Uma probabilidade posterior alta significa que o caso seria reconhecido, baseado nos resultados das suas variáveis, como pertencendo a um determinado grupo em particular. Isto é um passo preliminar necessário para se determinar a possibilidade de se elaborar uma classificação automática, e empresta sustentação e credibilidade à asserção subjetiva de que os grupos podem se diferenciar uns dos outros.

Resultados

Estudo A: Diferenciação entre normal, condiloma e NIC I

A tabela 1 mostra a média e o desvio padrão do índice núcleo/citoplasmático dos descritores físicos

ou parâmetros que medimos, os quais são área, perímetro e diâmetro máximo em 48 lâminas de biópsias do colo uterino, divididos em três grupos.

A tabela 2 mostra o diagnóstico histológico, a probabilidade posterior e o diagnóstico preditivo para os parâmetros usados, agrupados e analisados por análise multivariada. Claramente, houve um aumento progressivo no uso de todos os parâmetros estudados. Estes parâmetros mais a classificação por 10 classes de tamanho para área, perímetro e diâmetro máximo dos casos estudados produziram um alto índice de probabilidade posterior. Este estudo mostra que os descritores físicos poderiam discriminar entre os três grupos e poderiam ser utilizados com propósitos diagnósticos.

Estudo B: Diferenças entre tecidos histologicamente normais; VPH positivo e negativo

A tabela 3 mostra os resultados da média e do desvio padrão da média do índice núcleo/citoplasmático para área, perímetro e diâmetro máximo de 22 biópsias do colo uterino histologicamente normais, classificadas nos grupos VPH/DNA positivo e negativo pelo método de hibridização *in situ*. Nossos estudos mostram que as células VPH positivas têm consistentemente um núcleo maior.

A tabela 4 mostra que houve concordância entre o sistema estatístico multivariado com a classificação do patologista.

Estudo C: Diferenças entre condiloma com subtipos de alto e baixo risco

A tabela 5 mostra a média e o desvio padrão da média para 20 biópsias cervicais em amostras de pacientes portadoras de condilomas cervicais, classificadas como VPH/DNA de subtipos de baixo risco (subtipos 6 e 11) ou de alto risco (subtipos 16, 18, 31, 33, 35 e 51) por hibridização *in situ*. Todos os valores médios são mais altos para a categoria de maior risco. A tabela 6 mostra o erro de classificação de apenas um caso em cada subgrupo.

Tabela 1 – Valores médios dos descritores usados em 48 lâminas de biópsias do colo uterino:

Descritor (Índice N/C)	Normal Média (DP)	Condiloma Média (DP)	NIC I Média (DP)
Perímetro	0,51 (0,04)	0,68 (0,04)	0,74 (0,02)
Área	0,26 (0,05)	0,45 (0,06)	0,55 (0,04)
Diâmetro máximo	0,45 (0,04)	0,61 (0,05)	0,69 (0,03)

Onde: N/C é núcleo/citoplasmática; DP é desvio padrão.

Tabela 2 – Probabilidade posterior, diagnóstico histológico e diagnóstico preditivo morfométrico em 48 lâminas de biópsias do colo uterino.

Diagnóstico histológico	Probabilidade posterior			Diagnóstico preditivo
	Normal	Condiloma	NIC I	
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	1	0	0	Normal
Normal	0,98	0,02	0	Normal
Normal	0,998	0,002	0	Normal
Normal	0,999	0,001	0	Normal
Normal	0,999	0,001	0	Normal
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0	1	0	Condiloma
Condiloma	0,002	0,997	0,001	Condiloma
Condiloma	0	0,999	0,001	Condiloma
Condiloma	0	0,993	0,007	Condiloma
NIC I	0	0	1	NIC I
NIC I	0	0	1	NIC I
NIC I	0	0	1	NIC I
NIC I	0	0	1	NIC I
NIC I	0	0	1	NIC I
NIC I	0	0,001	0,999	NIC I

Onde: NIC I é Neoplasia Cervical Intraepitelial, grau I.

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos descritores para o índice núcleo/citoplasmático do perímetro, área e diâmetro máximo, de 22 biópsias do colo uterino, VPH/DNA negativo e positivo por hibridização *in situ*.

Descritor (Índice N/C)	VPH/DNA status	
	Negativo Média (DP)	Positivo Média (DP)
Perímetro	0,499 (0,04)	0,523 (0,04)
Área	0,248 (0,05)	0,277 (0,06)
Diâmetro máximo	0,444 (0,04)	0,448 (0,04)

Onde: N/C é núcleo/citoplasmático; VPH/DNA é vírus da papilomatose humana/ácido desoxirribonucléico; DP é desvio padrão.

Note a similaridade dos valores para células com VPH/DNA negativo com o valor das células normais na tabela 1.

Tabela 4 – Probabilidade posterior, diagnóstico por hibridização *in situ* diagnosis e diagnóstico morfométrico preditivo em 22 lâminas de biópsias de colo uterino histologicamente normais.

Diagnóstico por hibridização <i>in situ</i>	Probabilidade posterior VPH/DNA		Diagnóstico preditivo
	Negativo	Positivo	
Negativo	1	0	Negativo
Negativo	1	0	Negativo
Negativo	1	0	Negativo
Negativo	0,993	0,007	Negativo
Negativo	0,992	0,008	Negativo
Negativo	0,999	0,001	Negativo
Negativo	0,594	0,406	Negativo
Negativo	0,987	0,013	Negativo
Negativo	0,867	0,133	Negativo
Negativo	0,545	0,455	Negativo
Positivo	0	1	Positivo
Positivo	0	1	Positivo
Positivo	0,097	0,903	Positivo
Positivo	0,001	0,999	Positivo
Positivo	0,118	0,882	Positivo
Positivo	0,086	0,934	Positivo
Positivo	0,079	0,921	Positivo
Positivo	0,085	0,915	Positivo
Positivo	0,01	0,99	Positivo
Positivo	0,002	0,998	Positivo
Positivo	0,001	0,999	Positivo

Onde: HPV é vírus da papilomatose humana; DNA = ácido desoxirribonucléico.

Tabela 5 – Média e desvio padrão dos descritores para índice núcleo/citoplasmático de 20 biópsias cervicais, VPH/DNA de subtipos de baixo (6/11) e alto (16, 18, 31, 33, 35 e 51) risco por hibridização *in situ*.

Descritor (Índice N/C)	VPH/DNA	
	Baixo risco (DP)	Alto risco (DP)
Perímetro	0,646 (0,03)	0,680 (0,06)
Área	0,406 (0,04)	0,452 (0,07)
Diâmetro máximo	0,566 (0,03)	0,610 (0,07)

Onde: VPH/DNA é vírus da papilomatose humana/ácido desoxirribonucléico; N/C é núcleo/citoplasmática; DP é desvio padrão.

Tabela 6 – Probabilidade posterior, diagnóstico por hibridização *in situ* e diagnóstico morfométrico preditivo em 20 lâminas de biópsias de lesões condilomatosas do colo uterino.

Diagnóstico por hibridização <i>in situ</i>	Probabilidade posterior		Diagnóstico preditivo
	VPH/DNA		
	Baixo risco	Alto risco	
Baixo risco	0,952	0,048	Baixo risco
Baixo risco	0,983	0,017	Baixo risco
Baixo risco	0,997	0,003	Baixo risco
Baixo risco	0,991	0,009	Baixo risco
Baixo risco	0,81	0,19	Baixo risco
Baixo risco	0,287	0,713	Alto risco
Alto risco	0,13	0,87	Alto risco
Alto risco	0,141	0,859	Alto risco
Alto risco	0,343	0,657	Alto risco
Alto risco	0,075	0,925	Alto risco
Alto risco	0,394	0,606	Alto risco
Alto risco	0,01	0,99	Alto risco
Alto risco	0,046	0,954	Alto risco
Alto risco	0,715	0,285	Baixo risco
Alto risco	0,327	0,673	Alto risco
Alto risco	0,003	0,997	Alto risco
Alto risco	0	1	Alto risco
Alto risco	0,006	0,994	Alto risco
Alto risco	0,011	0,989	Alto risco
Alto risco	0,021	0,979	Alto risco

Onde: HPV é vírus da papilomatose humana; DNA é ácido desoxirribonucléico.

Discussão

Desde que o VPH foi implicado em processos displásicos e câncer cervical, pesquisadores têm tentado determinar a presença do vírus e seus subtipos, por meio de metodologias morfométricas e morfológicas. Fu e colaboradores⁽⁶⁾, usando a ploidia do DNA, histopatologia e morfometria, puderam diferenciar lesões contendo VPH 6 e 11 na base de morfometria.

Mariuzzi e colaboradores⁽⁹⁾, usando um sistema de análise de imagens em espécimes citológicos e histológicos, encontraram um aumento gradual no desarranjo fenotípico celular relacionado a progressão das lesões cervicais para a malignidade em características do núcleo e citoplasma.

Em nosso estudo, dois aspectos básicos foram abordados. Primeiro, a detecção das características morfométricas do VPH em tecido cervical aparentemente normal. Segundo, a identificação das lesões hospedeiras do VPH de baixo risco (subtipos 6 e 11) e de alto risco (subtipos 16, 18, 31, 33, 35 e 51) por meio de hibridização *in situ*.

O diagnóstico preditivo foi gerado pelo computador baseado no índice nuclear/citoplasmático para área, perímetro e diâmetro máximo, assim como as 10 classes da classificação distributiva para cada um destes parâmetros. Parâmetros isolados não poderiam ser usados devido à grande variabilidade biológica dos índices nucleares e citoplasmáticos.

Esta tarefa seria melhor executada utilizando-se a análise estatística multivariada. Este sistema estatístico depende da consideração simultânea de múltiplos descritores e foi preditora do diagnóstico morfométrico da maioria dos casos. A significância estatística nas diferenças da média individual não é exigida desde que a análise multivariada é baseada em entradas individuais.

O diagnóstico morfométrico preditivo foi mais seguro na identificação de VPH positivo em grupos histologicamente normais, do que em discriminar entre subtipos de alto e baixo risco em lesões condilomatosas, mas mostraram uma alta correlação entre diagnóstico por morfometria e hibridização *in situ*. Atualmente, o significado clínico destes achados é desconhecido.

Estes dados podem ser mais úteis em diagnósticos duvidosos. É claro agora que o uso de morfometria possa ajudar em uma avaliação mais eficiente das condições pré-neoplásicas e lesões relacionadas ao VPH.

No passado, usamos esquemas estatísticos mais robustos, por exemplo, o método de aproximação *k* para o diagnóstico de casos desconhe-

cidos tendo como base um banco de dados. Nós não mais fazemos isto, porque acreditamos que no futuro o problema pode ser melhor resolvido por uma rede de análise neural¹⁰.

Summary

This study addresses the following issues raised by HPV-related cervical lesions: 1) identification of the virus in histologically normal appearing tissue; 2) differential morphometric changes induced by the HPV subtype in condyloma, and 3) the morphometric differences between pure condyloma and CIN I.

We used the nuclear/cytoplasmic morphometric ratio for area, length, and maximum chord profiles. Forty eight cervical biopsy slides had been classified histologically into three groups: normal (22 cases), condyloma (20 cases), and CIN I (6 cases).

The HPV-DNA status obtained by in situ hybridization was used to study if histologically normal tissue would be recognized as HPV infected. The condyloma cases were then compared by morphometric analysis to the HPV-DNA subtype by "in situ" hybridization in order to differentiate HPV subtypes of low and high risk.

The morphometric parameters were assessed by multivariate analysis and showed to achieve a correct classification in all but two cases with a very high posterior probability.

We concluded that morphometric data are useful in the differential diagnosis among the HPV-related cervical lesions.

Key words: morphometry; image analysis; cervical dysplasia; cervical neoplasms; human papillomatosis virus; genital neoplasms; female; neoplasms; precancerous conditions.

Agradecimentos

Agradecemos às doutoras Tamara Kalir e Carol Eliassen e à engenheira-elétrica Zhyiuan Liu. O autor deste trabalho agradece à CAPES que financiou parte deste trabalho na forma de um programa de bolsa de estudo, processo número 1577/91-3.

Referências bibliográficas

1. BROKER, T.R.; BOTCHAN, M.T. – Pappilomavirus – Retrospectives and prospectives. In: Botchan MT, Grodzicker T, Sharp PA, eds. Cancer Cells, 4th ed. Cold Spring Harbor, pp. 7-35, New York, NY, 1986.
2. WRIGHT JR., T.C.; RICHART, R.M. – Role of Human Pappilomavirus in the pathogenesis of genital warts and cancer. *Gyn Oncol*, 37:151-164, 1990.
3. AMBROS, R.A.; KURMAN, R.J. – Current concepts in the relationship of Human Pappilomavirus infection to the pathogenesis and classification of precancerous

- squamous lesions of the uterine cervix. *Semin Diag Pathol*, 7:158-172, 1990.
4. GIL, J. – Image analysis in anatomical pathology: What are the issues? *Human Pathol*, 20:203-204, 1989.
 5. EINSTEIN, A.; UNGER, P.; BARBA, J.; GIL, J. – Nuclear diffuseness as a measure of texture theory and application to the diagnosis of parathyroid carcinoma. *J Microscopy* (under revision).
 6. GIL, J.; MARCHEVSKY, A.M.; SILAGE, D.A. – Applications of computerized interactive morphometry in pathology. I. Tracings and generation of graphic standards. *Lab Invest*, 54:222-227, 1986.
 7. BLEIWEISS, I.J.; HELLER, D.; DOTTINO, P.; CASS, I.; DELIGDISCH, L. – Identifying human papillomavirus subtypes in cervical biopsies with *in situ* DNA hybridization with biotinylated probes. *J Reprod Med*, 37:151-156, 1992.
 8. FU, Y.S.; HUANG, I.; BEAUDENON, S.; IONESCO, M.; BARRASSO, R.; DE BRUX, J.; ORTH, G. – Correlative study of human Pappilomavirus DNA, histopathology, and morphometry in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia. *Int J Gyn Path*, 7:297-307, 1988.
 9. MARIUZZI, G.M.; MONTIRONI, R.; DI LORETO, C.; SISTI, S. – Multiparametric quantification of the progression of uterine cervix preneoplasia towards neoplasia. *Path Res Pract*, 185:606-611, 1989.
 10. GIL, J.; BARBA, J. – Morphometry in image analysis for anatomic pathology. In: *Image Analysis. A primer for pathologic*. Editors by A. Marchevsky and P. Bartels. Raven Press, (in press), 1994.