

A classificação de Bethesda: uma análise morfométrica das biópsias do colo uterino

Carlos Roberto de Resende Miranda, M.D.¹, Liane Deligdisch, M.D.², Joan Gil, M.D.³, Peter Remson Dottino, M.D.⁴, Carmel Jonathan Cohen, M.D.⁵

Resumo

Com a possibilidade de se estender a classificação de Bethesda também para os laudos histológicos, consideramos neste trabalho alguns dos problemas mais importantes ligados às lesões relacionadas ao vírus da Papilomatose Humana (VPH), em particular a possibilidade de se estabelecer critérios para a definição diagnóstica entre lesões de alto e baixo grau. Comparamos características citológicas e histológicas de condições pré-cancerosas do colo uterino por meio de análise morfométrica.

Cortes histológicos de 62 espécimes de biópsias cervicais guiadas por colposcópico foram estudadas. Os casos foram agrupados de acordo com o diagnóstico histopatológico em três grupos: normal (33 casos), Lesão Intraepitelial de baixo grau (LIE-BG, 21 casos) e Lesão Escamosa Intraepitelial de alto grau (LIE-AG, 8 casos). Foram criados dois programas DRAW e COUNT3, considerando os seguintes parâmetros: área, perímetro, diâmetro máximo e circularidade dos núcleos das células nas lesões, e a celularidade da camada superficial do epitélio cervical.

Após as medições das células de interesse, os resultados eram submetidos a análise estatística multivariada, e computada a probabilidade posterior para confirmar a homogeneidade dos casos dentro do grupo diagnóstico. Área e celularidade parecem ser os parâmetros mais confiáveis. Apenas seis casos apresentaram a probabilidade posterior abaixo de 0,975. Os procedimentos morfométricos deram pleno suporte à distinção entre tecido escamoso normal, LIE-BG e LIE-AG.

Introdução

As classificações cito-histológicas para as condições pré-cancerosas do colo uterino incluem termos como: displasia, neoplasia epitelial cervical (NIC) e lesões escamosas intraepiteliais, estas últimas descritas como a Classificação de Bethesda.

O condiloma cervical tem sido reconhecido já há bastante tempo como uma doença sexualmente transmissível, causada pelo vírus da Papilomatose Humana (VPH). De outro lado, são recentes os

dados de pesquisas epidemiológicas, clínicas e de biologia molecular, implicando as infecções pelo VPH com displasia e câncer do colo uterino⁽¹⁾.

Os subtipos 6 e 11 do VPH são conhecidos por causarem condilomas ou verrugas no períneo, vulva, vagina ou no colo uterino. Os subtipos 16, 18, 31, 33, 35 e 51 também podem causar verrugas, mas eles têm mostrado por meio de técnicas de hibridização do DNA que podem se integrar ao DNA do núcleo de células displásticas e do carci-

¹Visiting Associate, Department of Pathology, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY. Professor Assistente, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade de Brasília, Brasil.

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, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY.

⁵Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY.
Endereço para correspondência: Carlos Miranda – Caixa Postal 4600 – 70919-970 – Brasília – DF.

noma cervical uterino. Estes subtipos de VPH possuem um risco aumentado para carcinoma cervical, enquanto os subtipos 6 e 11 são considerados de menor risco^(2,3).

A fim de avaliar esta nova situação, o National Cancer Institute dos Estados Unidos propôs a chamada Classificação de Bethesda (The Bethesda System) que tem algumas vantagens sobre outros sistemas de classificação citológica; por exemplo, a eliminação da classificação por classes numéricas, a avaliação da adequação da amostra e o uso de termos diagnósticos mais precisos. As lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau (LIE-BG) incluem alterações citológicas associadas ao VPH (coilocitose) e NIC I, enquanto as lesões escamosas intraepiteliais de alto grau (LIE-AG) incluem as antigas NIC II e III⁽⁴⁾.

Algumas críticas foram levantadas tanto por clínicos quanto por patologistas, e estas incluem o potencial de diagnosticar-se coilocitose como lesão pré-maligna (promovida a lesão à classe das lesões pré-malignas), tipagem desnecessária do subtipo do VPH, tratamento excessivo (colposcopia e biópsia), e há também o fato que esta terminologia não foi testada⁽⁵⁾.

Este estudo concerne estes problemas do ponto de vista morfométrico⁽⁶⁾. Com a possibilidade de se estender a classificação de Bethesda também para os laudos da histologia, tivemos por objetivo estudar as possibilidades de se definir um limiar entre lesões de alto e de baixo grau objetivamente por meio de estudos morfométricos⁽⁷⁾.

Material e métodos

Estudamos lâminas de 62 biópsias do colo uterino, guiadas por colposcópico, usando a análise morfométrica computadorizada.

Todos os casos estudados eram provenientes da clínica de colposcopia do Mount Sinai Hospital, como diagnóstico citológico prévio de condiloma ou displasia. As amostras eram fixadas em álcool, cortadas em fatias de 10 µm de espessura, montadas sobre uma lâmina de vidro e coradas com hematoxilina e eosina.

Cada lâmina foi revista por no mínimo dois patologistas, que concordaram na classificação histológica como: tecido escamoso normal, condiloma, NIC I, NIC II e NIC III. Subseqüentemente, condiloma e NIC I foram reclassificados como LIE-BG, e NIC II e III como LIE-AG.

O critério para o diagnóstico histológico de condilomas foi a presença de coilocitose, células atípicas com halo perinuclear e núcleo aumentado e irregularidade, disqueratose ou queratinização celular

individual e bi ou multinucleação em células superficiais e intermediárias.

Os critérios usados para definir NIC foram a perda de maturação celular, perda da polaridade epitelial, desarranjo das camadas epiteliais e células displásticas, representadas por aumento da relação do índice núcleo/citoplasmático, presença de nucléolos proeminentes, agrupamento cromático e figuras de mitose normais e anormais.

NIC I corresponde a células displásticas confinadas ao terço inferior do epitélio cervical, NIC II corresponde a células displásticas confinadas aos dois terços inferiores do epitélio cervical, e em NIC III as células displásticas excedem os dois terços inferiores da espessura do epitélio.

Estudamos a camada mais externa do epitélio ou superficial, a qual freqüentemente se caracteriza por células maiores, devido ao abundante citoplasma e núcleos picnóticos (enrugados e cromodensos).

Evitamos a medição de células queratinizadas. Os casos eram então divididos entre três grupos de acordo com o seu diagnóstico histológico: 33 casos normais, 21 casos LIE-BG e 8 casos LIE-AG.

Equipamento e procedimentos computadorizados

Para este estudo foi construído um sistema de análise de imagens, juntado ao redor de uma caixa de expansão que contém um microcomputador multi bus Intel-310/7, baseado sobre um microprocessador de 16-bit *80286 microprocessor* e um coprocessador matemático 80287 (Intel, Phoenix, AZ) com placas adicionais para o processamento de imagens (Imaging Technology, Woburn, MA), particularmente processador analógico AP-512 e a frame buffers FP-512.

A imagem era gerada por uma câmera colorida (Sony), instalada sobre um microscópio ótico (Nikon). Com propósitos de qualidade, a imagem é visualizada por meio de um monitor colorido de alta resolução, no entanto o periférico interativo é uma tela sensível ao toque, colocada sobre uma tela de vídeo monocromática de 13 polegadas.

O usuário faz os traçados dos núcleos sobre a tela sensível ao toque, imediatamente sobre a figura em tempo real. O processamento adicional é automático. O sistema funciona em MS-DOS (Microsoft) e é programado tanto em FORTRAN 77 ou C⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Para este estudo usamos dois programas de morfometria diferentes, DRAW e COUNT3.

DRAW foi usado para extrair descritores dos perfis nucleares traçados. O computador processa o traçado e calcula o perímetro, a área, diâmetro

Tabela 1 – Parâmetros analisados por análise multivariada a partir de 62 biópsias cervicais.

Descritor	Classificação		
	Normal Média (DP)	LIE-BG Média (DP)	LIE-AG
Perímetro	21,27 (3,2)	23,96 (4,29)	26,28 (5,32)
Área	31,71 (11,08)	39,5 (14,37)	50,43 (22,04)
Diâmetro máximo	8,04 (1,09)	9,14 (1,82)	9,77 (1,94)
Circularidade	19,44 (3,37)	21,14 (3,83)	24,16 (5,32)
Fator de circularidade	1,10 (0,05)	1,13 (0,07)	1,09 (0,03)
Celularidade (x1000)	2,43 (1,18)	2,88 (1,51)	4,14 (4,06)

Onde: LIE é lesão escamosa intraepitelial, BG é baixo grau, AG é alto grau, DP é desvio padrão.

máximo e o fator de circularidade de cada núcleo selecionado expresso em μm . Medimos 25 núcleos da camada superficial de cada lâmina. O aumento microscópico foi de 100x na objetiva e 10 vezes na ocular, com óleo de imersão.

COUNT3 foi usado para se contar o número de núcleos de 2 a 4 campos microscópicos diferentes da camada superficial do epitélio, e os resultados eram expressos em núcleos por μm^2 . Este procedimento consistiu em se traçar primeiramente a membrana basal da área de interesse e, dentro da área traçada, apontar todos os núcleos. O computador então calculava a extensão da membrana basal, o número de núcleos tocados, numa fração que resultava no que chamamos de índice de celularidade. Para o COUNT3 usamos objetivas microscópicas de 20x e ocular de 10x.

Depois das mensurações, o computador calculava a média e o desvio padrão da média para cada parâmetro de cada caso em particular.

A fim de avaliar os dados, foi usado um pacote comercial de análise multivariada de múltiplos descritores (Houston, TX). O computador avaliava cada caso considerando todos os descritores contra todos os grupos disponíveis e então determinava a probabilidade posterior.

Esta não é uma técnica classificatória. Ao contrário, ela determina se a classificação feita pelo patologista poderia ser reproduzida pelo instrumental na base dos descritores morfométricos.

Uma probabilidade posterior maior significa que aquele caso em particular tem uma alta similaridade com os outros casos no mesmo grupo. Veja que os grupos são formados pelo patologista e a probabilidade posterior é apenas uma avaliação a *posteriori* da homogeneidade interna dos grupos.

Resultados

O exame preliminar dos resultados sugere que os dados mais representativos provinham da camada superficial do epitélio, portanto, conduzimos nossos estudos nesta camada para a análise estatística. Os dados provenientes das camadas mais baixas do epitélio (basal, parabasal e intermediária) foram menos bem sucedidos em discriminar entre os grupos.

A tabela 1 mostra os descritores nucleares para perímetro, área, diâmetro máximo, circularidade, fator de circularidade e celularidade na camada superficial.

Aí podemos ver que os melhores discriminantes morfométricos pareceram ser o índice de celularidade e a área dos perfis nucleares, salientando as maiores diferenças entre os grupos.

A partir dos tecidos normal até LIE-AG, parece haver uma tendência para um aumento nos valores médios de todos os parâmetros, mostrando por exemplo que a área nuclear é maior para LIE-AG do que para LIE-BG, e que, por sua vez, LIE-BG

tem a média de área nuclear maior do que a área nuclear de células normais.

A tabela 2 mostra a probabilidade posterior e os diagnósticos preditivos e histológicos para todos os casos estudados.

A probabilidade posterior de quase todos os casos foi maior do que 0,975 (exceto seis casos).

Note que a classificação estatística multivariada não depende de significância estatística, justamente pelo termo comumente aceito em análise de variância, é multivariado. Um fator que é crítico para se definir as diferenças entre dois grupos pode ser notado para um terceiro. Devido a sua natureza, estatísticas da variância não são compatíveis com a classificação de casos individuais.

Discussão

A necessidade de normatização para os laudos histológicos, que levem em conta o papel do VPH e suas lesões correlatas, é notória⁽¹¹⁾. Uma opção poderia ser a adoção da classificação citológica de Bethesda também para os relatos histológicos.

Desde seu lançamento, esperava-se que a classificação de Bethesda fosse uma evolução que respondesse ao progresso no entendimento da neoplasia cervical e às necessidades cambiantes de clínicos e citopatologistas.

Os defensores da classificação de Bethesda advogam que os méritos deste sistema seriam: 1) a eliminação da designação numérica de Papanicolaou; 2) a avaliação da adequação da amostra, como parte integral do relatório diagnóstico, e 3) o uso de termos diagnósticos precisos para facilitar a comunicação clara entre citopatologistas e clínicos⁽⁵⁾.

Entretanto, a relevância da classificação de Bethesda tem sido contestada. Em um estudo prospectivo de 10 anos, de 528 mulheres com lesões VPH/DNA, Syrjanen e colaboradores estabeleceram que, "apesar dos objetivos definitivamente positivos, as desvantagens da classificação de Bethesda superariam suas vantagens, devido ao fato de que a simplificação da classificação em dois graus, mais do que na de três, como é na terminologia da NIC, inevitavelmente levaria a perda significativa de valorosa informação diagnóstica e prognóstica, aumentando o risco do paciente ser tratado desnecessariamente"⁽¹²⁾.

Nosso estudo mostra que os procedimentos morfométricos da camada superficial discriminam bem entre os graus da classificação de Bethesda, portanto sustentando sua validade objetiva.

O estudo também demonstrou a acurácia de um diagnóstico automatizado em tecidos cervicais,

tendo como base a classificação de Bethesda. O desenvolvimento da análise de imagens computadorizadas permitirá um melhor uso da morfometria no controle e avaliação das lesões cervicais pré-cancerosas.

Agradecimentos especiais

Tamara Kalir, M.D.; Carol Eliassen, M.D. and Zhyiuan Liu, M.S.E.E. Este trabalho foi financiado em parte pela CAPES, processo nº 1577/91-3, e pela Mount Sinai School of Medicine.

Summary

Because of the possibility of extending the Bethesda System to histologic reports, we consider in this morphometric study some of main issues involved in the HPV-related lesions, in particular the possibility of establishing a cut of between low and high-grade lesions. We compared histological and cytological features of cervical precancerous conditions by morphometric analysis.

Histologic sections from 62 colposcopically guided biopsies of the cervix were studied by computerized morphometry. The cases had been grouped according to the subjective diagnosis into three groups: normal (33 cases), Squamous Intraepithelial Lesions – Low Grade (SIL-LG, 21 cases), and Squamous Intraepithelial Lesions – High Grade (SIL-HG, 8 cases).

We carried out our study using programs called DRAW and COUNT3, that considers the following parameters: area, length, maximum chord, roundness, of the nuclei of cells in the lesion, and cellularity, from the outer layer of cervical epithelium (superficial).

After measurements of the cells of interest, we analyzed the results by multivariate analysis and computed posterior probabilities to confirm the homogeneity of the cases in the diagnostic groups. Area and cellularity seem to be the most reliable parameters. The posterior probability of all but six cases were higher than 0.975. Morphometric procedures fully support the distinction among normal squamous tissue, SIL-LG and SIL-HG.

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. NATIONAL CANCER INSTITUTE WORKSHOP – The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnosis. *Jama*, 262:931-934, 1988.
 5. KURMAN, R.J.; MALKASIAN, G.D.; SEDLIS, A.; SOLOMON, D. – From Papanicolaou to Bethesda: The rationale for a new cervical cytologic classification. *Obstet Gynecol*, 77:779-782, 1991.
 6. GIL, J. – Image analysis in anatomical pathology: What are the issues? *Human Pathol*, 20:203-203, 1989.
 7. CRUM, C.P.; NUOVO, G.J. – Intraepithelial lesions of the cervix. In: Crum CP, Nuovo GJ, eds. *Genital Papillomaviruses and Related Neoplasms*. 1st ed. Raven Press, pp. 106-128, New York, NY, 1991.
 8. GIL, J.; DELIGDISCH, L. – Interactive morphometric procedures and statistical analysis in the diagnosis of ovarian dysplasia and carcinoma. *Pathol Res Pract*, 185(5):680-685, 1989.
 9. DELIGDISCH, L.; MIRANDA, C. – Ovarian dysplasia: Nuclear texture analysis. *Cancer*, 72(11):3253-3257, 1993.
 10. DELIGDISCH, L.; HELLER, D.; GIL, J. – Interactive morphometry of normal and hiperplastic peritoneal mesothelial cells and dysplastic and malignant ovarian cells. *Hum Pathol*, 21(2):218-22, 1990.
 11. ROBERTSON, A.J. – Histopathological grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) – Is there a need for a change? *J Pathol*, 159:273-275, 1989.
 12. SYRJÄNEN, K.; KATAJA, V.; YLISKOSKY, M.; CHANG, F.; SYRJÄNEN, S.; SAARIKOSKI, S. – Natural history of cervical Human Papillomavirus lesions does not substantiate the biologic relevance of the Bethesda System. *Obstet Gynecol*, 79:675-682, 1992.