

Validação da metodologia de análise microscópica de sinais displásicos (oms) no epitélio de hiperplasias inflamatórias

Methodology validation of microscopic analysis of dysplastic signs (who) in the epithelium of inflammatory hyperplasias +

CARVALHO, Tiago Pinto*
 BADAUY, Cristiano Macabú**
 BARBACHAN, João Jorge Diniz***
 RADOS, Pantelis Varvaki****

RESUMO

O objetivo do presente estudo é demonstrar a existência de sinais displásicos em hiperplasias inflamatórias e buscar sua validação em relação ao número de campos microscópicos observados, uma vez que existe na literatura questionamentos sobre o seu potencial neoplásico. Foram sorteados 10 casos de hiperplasia inflamatória localizadas em rebordo alveolar, associadas ao uso de prótese entre os 55 casos registrados no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O material, submetido à técnica de coloração pela hematoxilina/eosina, foi avaliado de acordo com os critérios de displasia epitelial descritos pela OMS, sendo analisados 5, 7 e 9 campos aleatórios e em seguida comparados com a avaliação da extensão de todo o epitélio da lesão. Os resultados apresentaram sensibilidade de 57,14%, 85,71% e 100% para 5, 7 e 9 respectivamente; e a especificidade de 100%, para os 3 grupos. No âmbito deste estudo concluiu-se que a observação de nove campos aleatórios é confiável para a pesquisa de sinais displasia no revestimento epitelial de hiperplasias inflamatórias.

PALAVRAS CHAVE

Hiperplasia. Metodologia. Patologia Bucal. Diagnóstico Bucal.

REVISÃO DE LITERATURA

As hiperplasias inflamatórias são proliferações teciduais com manutenção do padrão morfofuncional celular. Um dos agentes etiológicos deste tipo de lesão em boca são as próteses desadaptadas (PINTO et. al. 1996; FLORES, 1998).

Castro (1997) e Coelho e Zucoloto (1999) em seus respectivos estudos relataram a presença de sinais displásicos no epitélio das hiperplasias inflamatórias presentes na superfície epitelial da mucosa ou da pele.

A displasia epitelial representa um conjunto de distúrbios na maturação celular com potencial de malignização (MONTENEGRO; FRANCO, 1992).

Segundo a OMS (KRAMER, 1978) os sinais de displasia epitelial são: perda de polaridade das células basais, estratificação da camada basal, aumento da relação núcleo/citoplasma, cristas interpapilares bulbosas ou em forma de gota, estratificação irregular do epitélio, mitoses acima da camada basal, figura mitótica anormal, pleomorfismo nuclear, hiperchromatismo nuclear, nucleólo aumentado, perda da aderência intercelular, ceratinização individual ou de grupos de células.

Na graduação histológica de sinais de displasia epitelial existe uma grande subjetividade e isto pode explicar as diferenças de interpretação quanto à observação de características displásicas nas hiperplasias inflamatórias, como demonstrado por Pindborg, Reibel e Holmstrup (1984) que avaliaram a concordância de diagnóstico de displasia epitelial, carcinoma in situ e carcinoma espinocelular de nove lesões entre patologistas utilizando apenas 1 campo por lâmina. A concordância entre os diagnósticos foi relativamente baixa, apenas em 3 casos houve concordância acima de 50%. Além disso, talvez segundo estes autores a variedade de metodologias empregadas para se estudar a presença de características de displasia no revestimento epitelial explique a diversidade de interpretações.

Wright e Shear (1985) observaram alterações epiteliais displásicas em campos adjacentes a lesões de carcinoma espinocelular. A característica displásica mais observada foi a duplicação da camada basal e distúrbios na maturação epitelial presentes em 80% dos casos. O hiperchromatismo nuclear estava presente em mais de 70% dos casos. Enquanto a perda de polaridade das células basais e a perda de aderência intercelular apresentaram uma frequência maior que 60%. Além disso, também foi observado neste estudo que as alterações displásicas no

epitélio são frequentemente multicêntricas.

Lumerman, Freedman e Kerpel (1995) realizaram um estudo retrospectivo para determinar as características clínicas de displasia epitelial em mucosa bucal em aproximadamente 50.000 biópsias recebidas no Laboratório de Patologia Bucal de Flushing, New York, entre os anos de 1974 e 1982. Destes foram selecionados os casos com diagnóstico de displasia epitelial. Para a avaliação microscópica, em toda a extensão do tecido. Foram observadas as características descritas pela OMS (KRAMER, 1978). O diagnóstico de displasia epitelial supunha a presença das seguintes características: duplicação da camada basal, hiperchromatismo nuclear e cristas epiteliais em forma de bulbo. De acordo com esses critérios os casos já diagnosticados como displasia epitelial (411) foram reavaliados e 308 (74,93%) tiveram seus diagnósticos confirmados. Os diagnósticos de 103 (25,07%) casos não foram confirmados como displasia epitelial não foram especificados no trabalho.

Pindborg, Daftary e Mehta (1977), realizaram a avaliação prospectiva de 7 anos com 107 casos de displasia epitelial bucal para reportar seu comportamento ao longo do tempo. Utilizando as mesmas características de displasia epitelial que seriam pro-

* Aluno do Curso de Odontologia da UFRGS

** Mestre em Patologia, UFRGS

*** Professor de Patologia Geral e Bucal das Faculdades de Odontologia da UFRGS e da PUC-RS

**** Professor do Curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS + Projeto de Iniciação Científica realizado no âmbito do PPGOdontologia- Patologia Bucal - UFRGS

postas um ano mais tarde pela OMS, examinaram histologicamente toda a extensão do epitélio. Seus resultados mostraram que 6,6% das lesões observadas apresentaram transformação maligna.

Bánóczy e Csiba (1976), realizaram estudo para definir a ocorrência de displasia epitelial em material histológico de 500 pacientes com leucoplasia bucal e reportar a sua experiência com o acompanhamento destes pacientes. A análise microscópica foi realizada em toda a extensão do epitélio utilizando os mesmos critérios descritos pela OMS. Foram diagnosticados 120 casos (24%) displasia epitelial e observados 13,2% de malignização destas lesões.

Shear e Pindborg (1980), realizaram estudo transversal com 68 casos de lesões verrucosas para descrever suas características microscópicas. Na avaliação histológica foram utilizadas seções representativas ao longo do epitélio e os critérios utilizados foram: presença de ortoceratinização, paraceratinização, ou não-ceratinização; presença de displasia epitelial, densidade do estrato espinhoso, papilas epiteliais em bulbo, intensidade e natureza do infiltrado inflamatório, presença associada de carcinoma verrucoso ou carcinoma espinocelular, presença de queratose e hiperplasia epitelial adjacente a lesão. A displasia epitelial foi observada em 66% dos casos. Em 29% dos casos foi observado a presença de carcinoma verrucoso e em 10% a presença de carcinoma espinocelular.

Baseado no que foi explicitado, o objetivo do presente estudo é o de validar uma metodologia de análise microscópica que utilize 5, 7 ou 9 campos para a observação de sinais de displasia epitelial descritos pela OMS (KRAMER, 1978) no revestimento epitelial de lesões bucais de hiperplasias inflamatórias associadas ao uso de prótese.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram levantados todos os casos de hiperplasia inflamatória, localizadas em rebordo alveolar, associadas ao uso de prótese, obtidos a partir de biópsia excisional, registrados no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, entre os anos de 1999 e 2003, totalizando 96 casos. Dentre esses, 10 casos foram randomizados por meio do programa Microsoft Excel®. O material analisado estava fixado em formalina neutra tamponada a 10%, emblocado em parafina, cortado em micrótomo com a espessura de 5 µm e submetido à técnica de coloração pela hematoxilina/eosina.

Foi feita a calibração entre o examinador e um patologista experiente quanto aos critérios de displasia epitelial descritos pela OMS (KRAMER, 1978) através do estudo de casos de carcinoma espinocelular, carci-

noma in situ, displasia epitelial (Kappa=0,63).

Após esta calibração, foram obtidas imagens fotográficas dos revestimentos epiteliais dos 10 casos de hiperplasias inflamatórias, através de microscópio óptico binocular Olympus® com aumento de 100x e 400x, resultando em 262 campos em 100x e 1103 campos em 400x. Cada aumento forneceu respectivamente a média de 26,2 e 110,3 campos por caso estudado.

Convencionou-se que para grupo de observação de cinco campos seria composto por dois campos em aumento de 100x e três campos em aumento de 400x. O grupo de sete campos compreenderia com três campos em 100x e quatro campos em 400x. No grupo de nove campos seriam quatro campos em 100x e cinco em 400x.

A seleção dos campos foi feita aleatoriamente, por meio da função de randomização do programa Microsoft Excel®. A partir destas imagens divididas em grupos por caso, foram registradas as características de displasia epitelial presentes em cada campo segundo os critérios da OMS (KRAMER, 1978) e após realizou-se a análise de todos os campos de cada caso utilizando os mesmos critérios utilizados anteriormente.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística para o cálculo da sensibilidade e da especificidade a fim de demons-

trar o quanto a análise de 5, 7 e 9 campos representa todos os campos de cada lesão (tabela de contingência).

Considerou-se sensibilidade a capacidade de identificar determinada característica microscópica de displasia quando esta estivesse presente no grupo avaliado e no grupo controle (avaliação de toda a extensão do epitélio). Considerou-se como especificidade a capacidade de identificar um epitélio sem displasia quando este não apresentava qualquer característica microscópica de displasia na avaliação do grupo controle.

A reprodutibilidade do examinador foi realizada pelo reexame de um campo a cada dez examinados, 15 dias após o exame inicial, obtendo-se um coeficiente Kappa = 0,76.

RESULTADOS

Através da análise morfológica dos casos de hiperplasia inflamatória selecionados foi possível constatar que nucléolos aumentados foram observados em 150 campos presente em 4 dos casos analisados. Os demais sinais displásicos mais freqüentemente observados foram a perda da aderência intercelular em 52 campos presente em 6 casos e a estratificação irregular do epitélio em 17 campos presentes em 2 casos. Já os demais sinais displásicos descritos pela OMS (KRAMER, 1978), não foram observados na amostra estudada (Figura 1).

Tabela 1. *Freqüência de observação de sinais displásicos no epitélio das hiperplasias inflamatórias provocadas por prótese total.*

Característica	Freqüência	Nº de casos
Nucléolo aumentado	150	4
Perda da aderência intercelular	52	6
Estratificação irregular do epitélio	17	2

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da FO/UFRGS

Em 3 casos a avaliação de 5, 7 e 9 campos aleatórios de cada caso não apresentou sinais epiteliais displásicos. Na avaliação da extensão de todo o epitélio destes casos também não foram observados sinais displásicos. Estes casos foram então utilizados para avaliação da especificidade. Observou-se uma especificidade de 100% para avaliação dos 5, 7 e 9 campos obtidos aleatoriamente, quando comparados com a avaliação de toda a extensão do revestimento epitelial da lesão (Figura 2).

Nos 7 casos restantes constatou-se a presença de características microscópicas de displasia epitelial na avaliação de 5, 7 e 9 campos aleatórios de cada caso.

Quando avaliados 5 campos aleatórios observou-se que em 4 casos (57,14%) todos os tipos de sinais displásicos presentes. Nos demais três casos (42,86%) constatou-se a ausência de um sinal displásico dentre todos

os observados.

A avaliação dos 7 campos permitiu a identificação de sinais displásicos em 6 (85,71%) dos 7 casos, na avaliação de 9 campos todos os sinais displásicos do respectivo caso foram visualizados (Figura 2).

O índice de sensibilidade obtido a partir da análise dos 7 casos que continham algum sinal displásico foi 57,14%, 85,71% e 100% respectivamente para a avaliação de 5, 7 e 9 campos aleatórios.

DISCUSSÃO

A observação e a interpretação da presença de sinais displásicos no revestimento epitelial das hiperplasias inflamatórias pode mudar significativamente o diagnóstico, o prognóstico e o tratamento das referidas lesões. Como demonstraram Pindborg, Reibel e Holmstrup (1984) a observação de um campo microscópico para o diagnóstico de

displasia epitelial é insuficiente para atingir níveis de concordância aceitáveis e por isso os mesmos autores sugeriram que a diversidade de metodologias empregadas para o diagnóstico de displasia epitelial pode alterar o resultado. Somando-se a isso Wright e Shear (1985) observaram que as alterações displásicas do epitélio são freqüentemente multicêntricas. Com base nesses estudos é que foi proposto validar uma metodologia de análise microscópica de sinais displásicos (OMS) no revestimento epitelial de hiperplasias inflamatórias que utilize 5, 7 e 9 campos aleatórios

A característica microscópica de displasia epitelial de forma mais prevalente foram os nucléolos aumentados, observados em 4 casos. A segunda característica mais prevalente foi a perda da aderência intercelular, presente em 6 casos. Entretanto os nucléolos aumentados foram observados em aumento de 400x vezes e a perda de aderência intercelular em aumento de 100x que tem menos campos registrados, portanto proporcionalmente a característica mais prevalente foi a perda da aderência intercelular observada uma vez a cada cinco campos de todos observados em 100x, enquanto o nucléolo aumentado foi observado uma vez a cada sete campos de todos observados em 400x (Figura 1).

Tendo isso em vista, o presente estudo procurou determinar a capacidade de metodologias de observação de 5, 7 e 9 campos aleatórios em representar toda a extensão do epitélio. Os resultados obtidos demonstraram que a análise de 5 campos aleatórios não foi capaz de representar toda a extensão do epitélio, apresentando um índice de sensibilidade de 57,14%. Este grupo falhou 3 vezes em confirmar algum sinal displásico, demonstrando não ser seguro, para a avaliação de displasia epitelial em hiperplasias inflamatórias, a observação de 5 campos microscópicos.

O grupo de observação de 7 campos aleatórios apresentou um índice de sensibilidade satisfatório (85,71%) onde em um caso não foi observada uma das características displásicas, a perda da aderência intercelular. O grupo de observação de 9 campos aleatórios não apresentou falhas na observação dos sinais displásicos presentes em toda a extensão do epitélio. Demonstrando ser igualmente satisfatório, ainda que o pequeno tamanho da amostra possa introduzir um viés ao estudo.

Para a análise de sinais displásicos observa-se a existência várias metodologias desenvolvidas para estes fins (Pindborg, Reibel e Holmstrup, 1984). São a estas variações que uma metodologia validada e confiável deve se sobrepor, permitindo diagnosticar corretamente as lesões e fornecendo interpretações comparáveis entre diversos tra-

balhos de pesquisa. Baseado nos dados obtidos neste estudo é nossa opinião que as observações de 7 ou 9 campos microscópicos aleatórios representam satisfatoriamente todas as características da extensão completa do epitélio.

No trabalho de Shear e Pindborg (1980) observa-se a descrição das características microscópicas do carcinoma verrucoso utilizando, para isto, seções representativas ao longo do epitélio. Entretanto, em seu estudo, estes autores não especificaram o número de campos avaliados e a metodologia para definir seções representativas.

Coelho e Zucoloto (2000) analisaram os laudos histopatológicos com o objetivo de determinar a ocorrência de sinais de displasia no revestimento epitelial das hiperplasias inflamatórias. Neste estudo, pressupõe-se o estudo e descrição de todo material presente na lâmina. A leitura de laudos, sem a observação direta das características microscópicas dentro do contexto inflamatório não seja uma metodologia confiável para este objetivo, por isso em nosso estudo partimos dos diagnósticos registrados, mas estendemos a avaliação para a observação microscópica, uma vez que sinais displásicos podem não ser relatados no laudo histopatológico.

Levando-se em consideração a preocupação do patologista em relatar sinais displásicos, pode-se considerar os estudos de Pindborg, Daftary e Mehta (1977); Bánóczy e Csiba (1980) e Lumerman, Freedman e Kerpel (1995) que observaram sinais de displasia epitelial em toda a extensão do epitélio de lesões bucais diagnosticadas como displasia epitelial. Entretanto, para o caso de lesões extensas, como são algumas das hiperplasias inflamatórias, e no caso de grandes amostras, este método consumiria muito tempo, sendo por isso necessária sua validação.

Para validar uma metodologia confiável e reprodutível que seja aplicável em lesões extensas e em amostras com um grande número de casos, o presente estudo testou a observação de 5, 7 e 9 campos aleatórios. A partir das metodologias utilizadas observou-se índices de sensibilidade satisfatórios e confiáveis na avaliação de 7 e 9 campos aleatórios, quando comparados à observação de toda a extensão do epitélio da lesão.

O índice de especificidade obtido no presente estudo além de demonstrar que a análise de 7 ou 9 campos aleatórios é confiável, justifica também o alto coeficiente obtido na calibragem do examinador.

CONCLUSÕES

A metodologia de análise de 9 campos microscópicos aleatórios é confiável para o estudo de sinais displásicos em revestimentos epiteliais de hiperplasias inflamatórias.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a reliable methodology for the microscopic study of dysplastic characteristics in the epithelial of the inflammatory hyperplasias. Were randomized 10 cases of inflammatory hyperplasia located in gingiva-alveolar mucosa, associated to use of prosthesis, stored in the files of the Laboratory of Buccal Pathology of the Federal University of Rio Grande do Sul. The cases were obtained from excise biopsy, fixed in formalin (10%) and paraffin-embedded. Every cases was cut in histological sections and stained with hematoxylin/eosin. The slides were evaluated in optical microscope (100 and 400x) for an examiner previously calibrated ($k=0,63$) in agreement with the criteria of epithelial dysplasia. Five, 7 and 9 fields of each case were evaluated and after compared with the analysis of the whole extension of the epithelium of the lesion. The results showed a sensibility of 57,14%, 85,71% and 100% for the 5th, 7th and 9th fields respectively; and a specificity of 100%, for the 3 groups. It was concluded that observation of five aleatory microscopic fields is satisfactory for the research of dysplastic characteristics in the epithelium of inflammatory hyperplasias.

KEYWORDS

Inflammatory hyperplasia. Oral pathology. Oral diagnostic. Epithelial dysplasia.

REFERÊNCIAS

BÁNÓCZY, J.; CSIBA, Á. Occurrence of Epithelial Dysplasia in Oral Leukoplakia. *Oral Surg. Oral Med. Oral. Pathol.*, St. Louis, v. 42, no. 6, p. 766-774, Dec. 1976.

CASTRO, A.L. **Hiperplasia Fibrosa Inflamatória de Fórnix do Vestíbulo Bucal: Estudo Clínico e Histológico de 665 casos.** 1997. 98 f. Tese (Livro Docência) – Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

COELHO, C.M.; ZUCOLOTO, S. Proliferative Activity of Denture - Induced Fibrous Inflammatory Hyperplasia Analyzed by Proliferating Cell Nuclear Antigen Labeling Index. *Int. J. Prosthodont.*, Lombard, v. 12, no. 1, p. 73-77, Jan./Fev. 1999.

COELHO, C.M.; ZUCOLOTO, S. LOPES, R.A. Denture - Induced Fibrous Inflammatory Hyperplasia: A Retrospective Study in a School of Dentistry. *Int. J. Prosthodont.*, Lombard, v. 13, no. 2, p. 148-151, Mar./Apr. 2000.

FLORES, M.M. Hiperplasia Papiloma-

tosa Inflamatória: Aspectos Clínicos, Histo-patológicos y Terapêuticos. **Acta. Odontol. Venez.**, Caracas, v. 36, no. 2, p. 34-41, 1998.

KRAMER, I.R. et. al. Definition of Leukoplakia and Related Lesions: An Aid to Studies on Oral Precancer. **Oral Surg. Oral Med. Oral. Pathol.**, St. Louis, v. 46, no. 4, p. 518-539, Oct. 1978.

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral Epithelial Dysplasia and the Development of Invasive Squamous Cell Carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral. Pathol.**, St. Louis, v. 79, no. 3, p. 321-329, Mar. 1995.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992. 263 p.

PINDBORG, J.J.; DAFTARY, D.K.; MEHTA, F.S. A Follow-up Study of Sixty-one Oral Dysplastic Precancerous Lesions in Indian Villagers. **Oral Surg. Oral Med. Oral. Pathol.**, St. Louis, v. 43, no. 3, p. 383-390, Mar. 1977.

PINDBORG, J.J.; REIBEL, J.; HOLMS-TRUP, P. Subjectivity in Evaluating Oral Epithelial Dysplasia, Carcinoma in Situ and Initial Carcinoma. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 14, no. 7, p. 559-564, Oct. 1984.

PINTO, T.A.S. et. al. Estudo da Prevalência de Arterioesclerose em Biópsias de Hiperplasia Inflamatória da Mucosa Bucal. **Rev. Fac. Odontol.**, Porto Alegre, v. 37, n. 2, p. 11-14, dez. 1996.

SHEAR, M.; PINDBORG, J.J. Verrucous Hyperplasia of the Oral Mucosa. **Cancer**, New York, v. 16, no. 6, p. 1855-1862, Oct. 1980.

WRIGHT, A.; SHEAR, M. Epithelial Dysplasia Immediately Adjacent to Oral Squamous Cell Carcinomas. **J. Oral Pathol.** Copenhagen, v. 14, no. 7, p. 559-564, Aug. 1985.

Endereço para correspondência:

Faculdade de Odontologia (UFRGS)

Rua Ramiro Barcelos, 2492

POA/RS - CEP 90035-003

