

LUÍSE MEURER

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA E DENSIMÉTRICA
ATRAVÉS DE ASSINATURA NUCLEAR DIGITAL
EM BIÓPSIAS DE ESÔFAGO**

Dissertação apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Medicina:
Gastroenterologia da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, para obtenção do
grau de Mestre.

Orientadores:
Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva
Prof. Dr. João Carlos Prolla

Porto Alegre
2000

À família e aos afetos, que
conferem equilíbrio e
tornam a vida mais plena
de sentido.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Prolla, pela orientação segura e seu exemplo de dedicação à ciência.

Ao Dr. Vinicius Duval da Silva, pela orientação e ajuda.

Ao Prof. Dr. Sérgio Gabriel Silva de Barros, pelo apoio e auxílio.

Ao Dr. Sanford M. Dawsey, do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, por ceder os casos e empenhar-se na discussão dos resultados.

Ao Dr. Klaus J. Lewin, da Univesidade da Califórnia em Los Angeles, por sua disponibilidade em participar do meu treinamento, rever as lâminas e discutir os diagnósticos.

Ao Prof. Dr. Peter H. Bartels e Msc. Deborah Thompson, pela disponibilização do laboratório de Ciências Ópticas do Arizona e que, ao partilhar de seu conhecimento acumulado, permitiram a realização deste trabalho.

Ao Dr. Antônio Carlos Kruehl Pütten, professor, sócio e amigo, sempre presente com idéias e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelas oportunidades oferecidas.

A todas as funcionárias da Unidade de Citopatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela atenção e comprometimento constante com a qualidade.

Ao Laboratório Medicina Digital, especialmente à sócia e amiga Nara Pütten Lucchesi, sempre disponíveis para o que fosse necessário.

A Patrícia Ribeiro, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia, pelo apoio.

Aos amigos, especialmente a Rosália Graebin Guimarães, com cuja paciência e apoio sempre pude contar.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS, vi

LISTA DE TABELAS, vii

RESUMO, viii

ABSTRACT, ix

1. INTRODUÇÃO, 1

2. OBJETIVOS, 16

3. MATERIAL E MÉTODOS, 17

4. RESULTADOS, 21

5. DISCUSSÃO, 34

6. CONCLUSÕES, 43

7. ANEXOS, 44

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Histograma-modelo de assinatura nuclear, 14
Figura 2. Assinaturas nucleares nos casos normais, 22
Figura 3. Assinaturas nucleares dos casos de displasia leve, 23
Figura 4. Assinaturas nucleares dos casos de displasia moderada, 24
Figura 5. Assinaturas nucleares dos casos de displasia acentuada, 25
Figura 6. Assinaturas nucleares dos casos de carcinoma escamoso, 26
Figura 7. Assinaturas de padrão histológico das categorias diagnósticas, 28
Figura 8. Histogramas de densidade óptica das categorias diagnósticas, 30
Figura 9. Análise das funções discriminantes e valores de densidade óptica por categoria diagnóstica, 32
Figura 10. Valores de densidade óptica total por categoria diagnóstica e seus intervalos de confiança (95%), 32
Figura 11. Valores de matriz de comprimento de seqüência (característica 280) e seus intervalos de confiança (95%) por categoria diagnóstica, 33

ANEXOS

- Figura 1. Biópsia normal, 46
Figura 2. Displasia leve, 46
Figura 3. Displasia moderada, 47
Figura 4. Displasia acentuada, 47
Figura 5. Carcinoma escamoso invasor, 48
Figura 6. Carcinoma escamoso invasor, 48

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Valor de função discriminante e densidade óptica total por categoria diagnóstica, 32

Tabela II. Valores de densidade óptica total e seus intervalos de confiança (95%) por categoria diagnóstica, 33

Tabela III. Valores de matriz de comprimento de seqüência (característica 280) e seus intervalos de confiança (95%) por categoria diagnóstica, 33

ANEXOS

ANEXO 2

Tabela I. Identificação dos casos, categorias diagnósticas e valores de assinatura nuclear média por caso, 45

Tabela II. Comparação entre o diagnóstico histológico inicial (Diagnóstico 1) e o diagnóstico efetuado nas mesmas lâminas onde foram realizadas as medidas cariométricas (Diagnóstico 2), 49

RESUMO

Foram estudadas, pelo método da assinatura digital, 35 biópsias esofágicas provenientes de pacientes da província de Linxian, China, classificadas por dois observadores com ampla experiência em patologia gastrointestinal como normais, displasias ou carcinomas (8 casos normais, 6 displasias leves, 8 displasias moderadas, 4 displasias acentuadas, 4 carcinomas suspeitos de invasão e 5 carcinomas invasores). O objetivo do trabalho foi caracterizar os núcleos das populações celulares desses casos de forma que permitisse a derivação de informações diagnósticas e de possível implicação prognóstica a partir do estudo quantitativo das características nucleares de cada caso ou categoria diagnóstica. As biópsias foram coradas pelo método de Feulgen, sendo então selecionados e digitalizados 48 a 50 núcleos de cada uma delas. De cada núcleo foram extraídas 93 características cariométricas, arranjadas arbitrariamente em histograma designado como assinatura nuclear. Da média aritmética de cada característica dos núcleos de uma mesma biópsia resultou a assinatura digital do caso. A análise de funções discriminantes, baseada nas 15 características cariométricas que ofereceram melhor discriminação entre as categorias diagnósticas, mostrou que o grupo classificado como normal foi claramente distinto das demais categorias. A densidade óptica total aumentou progressivamente segundo a classificação das biópsias, do normal à displasia acentuada, sendo o valor do carcinoma semelhante ao da displasia moderada. A matriz de comprimento de seqüência apresentou o mesmo perfil, ou seja, ambas as características ofereceram discriminação clara entre as categorias diagnósticas, com exceção do carcinoma invasor, cujos valores foram superponíveis aos da displasia moderada. O estudo demonstrou a viabilidade da quantificação de características nucleares através das assinaturas nucleares digitais, que demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre diferentes categorias diagnósticas e a elevação progressiva dos valores mensurados relacionados com o espectro das lesões, apresentando-as como um histograma (assinatura digital nuclear).

ABSTRACT

35 esophageal biopsies of patients from the Linxian province in China, classified by two experienced gastrointestinal pathologists as normal, dysplasias or carcinomas (8 normal cases, 6 mild dysplasias, 8 moderate dysplasias, 4 severe dysplasias 4 carcinomas suspicious of invasion and 5 invasive carcinomas) were studied by the method of digital signature. The aim of this study was to characterize the nuclei of these cases cell populations in such a way that diagnostic and prognostic information could be derived from the nuclear quantitative features of each case or each diagnostic category. The biopsies were stained by the Feulgen method, a stechiometric reaction, 48 to 50 nuclei from each biopsy being selected and digitized. 93 kariometric features were obtained from each nucleus and placed arbitrarily in a histogram designated as nuclear signature. The nuclear signatures of a case resulted from the mean values of each nuclear feature of the same biopsy, divided by the standard deviation of the normal cell population. The analysis of discriminant functions, based on the 15 kariometric features with the best discrimination power among diagnostic categories, revealed that the group classified as normal was clearly distinct from the other groups. Optical density augmented progressively according to the biopsy classification from normal to severe dysplasia, the value for carcinoma being similar to that for moderate dysplasia. The run length matrix showed the same profile, that is, both features offered clear discrimination among diagnostic categories, except invasive carcinoma, whose values overlapped those for moderate dysplasia. The study demonstrated the feasibility of the examination of quantitative nuclear features, revealing statistically significant differences among the various diagnostic categories and the progressive elevation of measured values in relation to the increasing degree of the lesion, and demonstrating such differences as histograms (nuclear signatures).

1. Introdução e revisão da literatura

O carcinoma epidermóide é a neoplasia mais comum do esôfago, constituindo-se em um dos tumores malignos mais freqüentes e mais letais do mundo. Tem incidência especialmente elevada em países subdesenvolvidos, sendo três vezes mais comum em homens que em mulheres (1, 2).

Diferenças geográficas em sua incidência estão bem documentadas, tendo sido identificados diversos focos em que o tumor tem incidências muito mais elevadas. Enquanto a incidência em países desenvolvidos gira entre 2,6 e 4,0 em 100.000 habitantes(3), em vários países menos desenvolvidos estes números são muito diferentes. Estas áreas incluem a China (onde, em algumas áreas a mortalidade em 1973-1975 atingiu 161/100.000 homens) (4) , Irã, Casaquistão, norte da Argentina, sul do Brasil (5), França, Suíça e partes da África (6). No Brasil, os dados de 1999 colocavam o câncer de esôfago como a 4a causa de mortalidade entre homens (5,11/100.000), 6a entre as mulheres (1,56/100.000) e 6o. quando considerados ambos os sexos (4,77/100.000). A estimativa de incidência no Rio Grande do Sul disponível na página do Instituto Nacional do Câncer (INCa) na Internet (www.inca.org.br) é de 20,93/100.000 homens, colocando-se como 4a neoplasia maligna mais incidente. A mortalidade estimada para o mesmo ano de 2000 é de 12,53/100.000 homens, o que coloca o câncer esofágico como 3a causa de óbito. Dados ainda não publicados por Dietz, obtidos por comunicação oral, indicam, no Rio Grande do Sul, uma mortalidade de 15,6/100.000 homens e 3,9/100.000 mulheres no ano de 1998, com tendência à estabilidade, quando considerados os últimos 13 anos.

Estas diferenças geográficas fazem crer que existam diferentes patogêneses, embora a neoplasia surja em uma mesma localização e envolva o mesmo tipo de célula (epitelial escamosa).

Em suas fases iniciais, os carcinomas de esôfago são geralmente assintomáticos, vindo a manifestar-se apenas em suas fases mais avançadas, o que leva a um diagnóstico quase invariavelmente tardio. Considerando que o fator prognóstico mais importante é a extensão da doença (7), esse diagnóstico tardio, por si só, implica em um mau prognóstico (8). Nos carcinomas superficiais a situação é um pouco diferente. Na literatura ocidental os carcinomas superficiais são definidos como sendo aqueles que não invadem além da submucosa, independente da presença de metástase em linfonodos (9). Já as literaturas japonesa e chinesa definem o carcinoma esofágico precoce como sendo a lesão que não invade além da submucosa e não apresenta metástases (10). Utilizando-se qualquer uma das definições, lesões superficiais ou precoces têm prognóstico melhor. Os estudos neste sentido, provenientes basicamente da França e, especialmente, do Japão, mostram um percentual entre 3 e 23% dos carcinomas como sendo superficiais ao diagnóstico, tendo tais índices melhorado nos últimos anos. Estes pacientes têm sobrevivência de 86% em 5 anos e 56% em 10 anos depois da ressecção, atribuindo-se a maioria dos óbitos a causas outras que não o carcinoma epidermóide do esôfago (9).

As estratégias no sentido de modificar este panorama baseiam-se em dois pontos: a busca de fatores etiológicos e o diagnóstico mais precoce das lesões.

Em termos etiológicos, enquanto os casos em populações de baixo risco estão geralmente associados ao consumo de álcool e tabaco, nas populações de alto risco esta relação é menos clara (11). Nessas populações de alto risco, muito se tem investido na pesquisa de deficiências de fatores nutricionais (12, 13), carcinógenos ambientais (1, 14), esofagite crônica (15), fatores genéticos. A possibilidade de relação do carcinoma epidermóide do esôfago com infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) (16) tem sido explorada por alguns grupos.

A esofagite pré-existente também permanece como tema de debate. Estudos realizados em populações chinesas e iranianas, publicados entre 1979 e 1984 mostraram a relação da esofagite e da atrofia com o carcinoma escamoso, quando não associadas à doença de refluxo (17-19). Estudos mais recentes e com período de seguimento mais longo, no entanto, não conseguiram confirmar tal relação (20, 21). O que se supõe neste sentido é que, embora não possam ser consideradas como um fator de risco isolado ou lesão precursora do carcinoma epidermóide do esôfago, esofagites moderadas a acentuadas poderiam criar um ambiente favorável ao seu desenvolvimento (22).

Fatores predisponentes genéticos, de um modo geral, não parecem ter um papel muito importante no câncer de esôfago. Em estudo realizado em Singapura entre imigrantes chineses, a geração nascida em Singapura tinha apenas 40% do risco de câncer de esôfago, quando comparada com a geração nascida na China (6). Sua relação com a tilose, uma doença rara, autossômica dominante, caracterizada por hiperqueratose palmar e plantar, no entanto, está bem documentada (23) (24).

No que tange a relação do HPV com a carcinogênese no esôfago, os dados são controversos. Syrjänen, em 1982, chamou atenção para alterações morfológicas semelhantes às lesões condilomatosas em 24 de 60 carcinomas esofágicos estudados (25). Numerosos trabalhos posteriormente realizados utilizando técnicas diversas, tais como métodos sorológicos, hibridização "in situ" e PCR (reação da polimerase em cadeia) mostraram resultados muito discordantes (16, 26-28).

Acreditava-se que pacientes com acalásia desenvolviam carcinomas esofágicos mais precocemente que a população em geral (29), mas que o tratamento precoce da doença reduziria significativamente tal risco (30). Estudos mais recentes, no entanto, vieram a mostrar que pacientes portadores de acalásia, mesmo tratada, têm um risco significativamente mais alto de desenvolver a neoplasia (31-33), e que o acompanhamento de casos com 15 a 20 anos de evolução através de endoscopia (34, 35) ou mesmo cromoendoscopia (36) é necessário.

Tanto no sentido de buscar fatores etiológicos quanto no de fazer diagnósticos mais precoces, o estudo de populações de alto risco, por ser capaz de envolver um grande número de casos num período relativamente curto, é de grande interesse(5). Este é o motivo pelo qual uma das regiões em que este tumor tem sido estudado mais profundamente é a China, onde os estudos de rastreamento populacional em áreas de risco foram iniciados em 1959 (8, 37).

Os estudos citológicos, realizados no esforço para que o diagnóstico do carcinoma de esôfago fosse feito mais precocemente, abriram o leque das discussões sobre as lesões precursoras. Os estudos realizados em Linxian, China, acompanhando uma população de alto risco para carcinoma de esôfago, provaram que tanto as displasias moderadas e acentuadas quanto o carcinoma "in situ" estão associados

a risco aumentado de câncer esofágico num período tão curto como 3,5 anos (21). Quanto maior o grau da displasia, maior o risco, embora a displasia acentuada e o carcinoma *in situ* tenham apresentado riscos idênticos para o desenvolvimento de neoplasia invasora.

Antes que fossem realizados estudos de impacto epidemiológico, muito se discutiu em torno da nomenclatura e da importância dos diferentes graus de alteração naquilo que se quis chamar de lesão precursora.

As controvérsias começam na definição de normalidade (38, 39). Em 1994, usando as categorias previamente descritas, Dawsey, Lewin e colaboradores (40), após reverem algumas centenas de biópsias provenientes dos estudos em Linxian, passaram a utilizar como definição de normalidade em esôfago um epitélio escamoso estratificado bem orientado, contendo uma zona basal e uma zona superficial, com ou sem lâmina própria. A zona basal foi definida como incluindo as células da lâmina basal até o nível em que os núcleos estivessem separados por um diâmetro nuclear. A zona superficial, incluindo todo o epitélio acima da zona basal, seria aquela composta por células escamosas que se tornam achatadas na medida em que vão se aproximando da superfície. Dentro destas definições, linfócitos esparsos são admitidos dentro do epitélio, desde que não haja evidência de dano tissular. Queratinização e paraceratose não são consideradas normais.

Displasia, por outro lado, é um termo antigo e controverso em medicina, que, literalmente, significa “desenvolvimento tecidual anormal”, sendo utilizado com diferentes sentidos em diferentes órgãos (rins displásicos, displasia mamária, displasia no colo uterino). O termo inicialmente cunhado por Papanicolaou foi discariose, referindo-se a células num estado intermediário entre o normal e o carcinoma (41). O termo displasia passou a ser aplicado, a partir de 1953, a estas células discarióticas que exfoliavam das lesões do colo uterino (42), tendo sido definido posteriormente por um comitê internacional de nomenclatura, cujas recomendações foram publicadas em 1962 (43). Desse modo, a palavra displasia, em epitélios, é usada no sentido de alterações arquiteturais e citológicas. Isso significa dizer, por exemplo, núcleos aumentados de volume e hiper cromáticos, aumento do número de mitoses, perda de maturação do epitélio. É consenso que, quanto mais baixo o grau de displasia, maior é a maturação do epitélio.

Nas lesões que formam um contínuo, a classificação, apesar de necessária para a comunicação entre patologistas bem como entre estes e os clínicos, é sempre algo arbitrário, já que se baseia em descrições e na capacidade do observador de perceber diferenças (44). No colo uterino, um dos sítios em que as lesões precursoras de carcinoma mais foram estudadas, as classificações para achados citológicos e histológicos são diferentes, e ainda não há consenso entre a utilização de sistemas que categorizam as lesões em três graus (neoplasia intra-epitelial graus I, II e III, em substituição ao sistema prévio de displasia leve, moderada, acentuada e carcinoma “*in situ*”) (45), ou em dois graus (lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau e lesão escamosa intra-epitelial de alto grau) (46). A exemplo disso, no tubo gastrointestinal ainda existe muita controvérsia, e o estômago pode ser tomado como um modelo deste debate. Os critérios inicialmente publicados por Nakamura em 1966 (47) foram diversas vezes revisitados, até que Centro de Referência para Classificação Histológica de

Lesões Pré-Cancerosas do Estômago da Organização Mundial da Saúde foi reunido, em 1978, definindo as lesões precursoras do câncer gástrico e dividindo as displasias em leve, moderada e acentuada (48). Os critérios ali publicados, no entanto, incluíam alterações reativas na classe das displasias leves, causando certa confusão no manejo destes pacientes. Em função disso, em 1984 novos critérios foram publicados, restringindo-se o uso da palavra displasia para epitélios de aparência neoplásica (49). A idéia de dividir as displasias gástricas em duas categorias (já que o manejo deste pacientes também oferece apenas duas opções – acompanhamento mais freqüente ou excisão da lesão) tem ganhado força, de maneira que algumas publicações falam em displasia de baixo grau e displasia de alto grau (50). Outro ponto a ser destacado é a diferença de nomenclatura utilizada entre os patologistas ocidentais e da Sociedade Japonesa de Pesquisa em Câncer Gástrico, já que os japoneses utilizam como critério para o diagnóstico de carcinoma apenas o grau de atipia citológica, independente da presença ou ausência de invasão da lâmina própria, resultando em amplas diferenças inter-observador em estudos internacionais (51-54). A publicação da classificação de Viena (55), ao reunir representantes de ambos grupos de patologistas, busca consenso no diagnóstico das lesões do trato-gastrointestinal, estabelecendo cinco categorias diagnósticas: (1) negativo para neoplasia/displasia, (2) indefinido para displasia/neoplasia, (3) neoplasia não-invasiva de baixo grau (displasia/adenoma de baixo grau/suspeito de carcinoma invasor), (4) neoplasia não-invasiva de alto grau (displasia/adenoma de alto grau) e (5) neoplasia invasora (carcinoma intramucoso, com invasão submucosa ou além). O debate e as publicações envolvendo as lesões escamosas do esôfago não são tão numerosos. A classificação tradicional das lesões pré-neoplásicas é a divisão em displasia leve, moderada e acentuada, e critérios específicos para seu enquadramento têm sido publicadas, especialmente a partir dos estudos realizados na China. As anormalidades do tipo atipia nuclear (aumento do tamanho nuclear, pleomorfismo e hiper Cromasia nucleares), perda de polaridade e maturação celular foram chamadas de displasia leve quando estavam confinadas ao terço inferior do epitélio, e displasia moderada quando envolviam os dois terços inferiores do epitélio. O diagnóstico de displasia acentuada exige o envolvimento do terço superior ou o envolvimento de toda a espessura do epitélio (20, 21, 40). Estudo recentemente publicado (54) reuniu dois grupos e propôs-se a comparar os diagnósticos de lesões escamosas do esôfago entre patologistas ocidentais e japoneses. A avaliação dos 21 casos de lesões esofágicas superficiais mostrou índices muito baixos de concordância (kappa de 0,04, sendo que este índice é considerado razoável a partir de 6,0), já que os critérios utilizados para as classificações são essencialmente diferentes. Enquanto invasão é o critério básico para que patologistas ocidentais dêem o diagnóstico de carcinoma, patologistas da escola japonesa consideram características nucleares mais importantes. A sugestão final deste estudo foi que se agrupasse a displasia de alto grau, carcinoma não invasivo e suspeitas de carcinoma em uma única categoria de “neoplasia não-invasiva de alto grau”. Por outro lado, em estudos basicamente ocidentais, classificar as displasias escamosas do esôfago em apenas dois graus (displasia de baixo grau e displasia de alto grau), a exemplo do que acontece no colo uterino parece ser uma tendência atual. Se as displasias moderadas vão ser

enquadradas como displasia de baixo grau ou displasia de alto grau é uma questão que ainda permanece em aberto (9, 56).

Em uma determinada escola ou uma vez definido o esquema de classificação a ser utilizado, o diagnóstico das lesões precursoras, pelo patologista, de um modo geral, não se constitui em um grande problema, desde que tenha a experiência necessária.

Dentro do espectro de lesões, de displasias menos graves para displasias mais graves e carcinomas invasores, o patologista não pode, entretanto, pela morfologia tradicional, determinar quais as lesões, dentro de uma mesma categoria diagnóstica, são as que têm potencial de progredir e quais ficarão estáveis ou regredirão.

Se, por um lado, a patologia é a ciência que estuda as causas, mecanismos e conseqüências das doenças (57), por outro lado, a metodologia diagnóstica em citopatologia e anatomia patológica é sabidamente baseada no reconhecimento visual e interpretação de padrões e apresenta, por conseguinte, consistente variabilidade interobservador e intraobservador, as quais derivam parcialmente da complexidade e/ou sutileza de achados morfológicos. Essa variabilidade existe em métodos considerados simples, como a contagem no número de mitoses, que, além de ser fator determinante em alguns diagnósticos, como os tumores de músculo liso (onde a contagem de mitoses é um dos principais critérios de malignidade), tem importância prognóstica bem definida (58). Alguns estudos mostram graus pequenos de concordância intra-observador na avaliação de tumores de mama, especialmente por patologistas considerados menos experientes. A concordância chega a ser tão baixa quanto 47 a 60%, enquanto entre os patologistas mais experientes, a releitura da mesma lâmina obteve resultados semelhantes em 70% das vezes (59).

A razão de tais diferenças reside em fatores muito diversos, que incluem as imagens mentais (“templates”) que cada profissional tem para cada lesão patológica, órgão ou gradação (que por sua vez está intimamente relacionada com a sua formação e experiência pessoal, inclusive dentro de uma área específica (60)), e as diferentes ênfases que cada um dá aos diversos critérios que formam as categorias diagnósticas (61).

Em tal contexto, a aplicação de metodologias como a morfometria e análise de imagens digitais, que permitem a mensuração, com descrição quantitativa e, conseqüentemente mais objetiva de núcleos celulares em preparados histológicos pode contribuir no estabelecimento de critérios objetivos para as lesões precursoras do carcinoma epidermóide do esôfago.

A morfometria tem sua origem na cartografia, tendo sido utilizada para medir distâncias em mapas geográficos. Nos primórdios de seu uso na patologia, tais estudos envolviam não apenas a mensuração de áreas em seções histológicas, mas também a avaliação de volumes, formas e áreas totais de superfície. Essas estimativas forneciam a informação necessária para desenhos realizados através de técnicas manuais com posterior representação dos objetos em madeira ou metal. Tal metodologia, no entanto, era tediosa e cara, sendo aos poucos substituída pela estereologia nas avaliações de volume. Atualmente, na patologia, o termo morfometria é utilizado para designar técnicas quantitativas que medem características tais como tamanho, área e textura em estruturas teciduais (62, 63),

enquanto a estereologia obtém dados tridimensionais a respeito de estruturas microscópicas a partir de cortes histológicos (64). O uso dos computadores em medicina veio a facilitar a execução destas tarefas, através da análise de imagem digital.

A análise de imagem digital é baseada na aceitação da hipótese de que a representação bidimensional de um objeto pode ser interpretada pela análise do arranjo de unidades numéricas definidas, ou picture elements (pixels) que a compõe. Desse modo, imagens digitais podem ser submetidas a operações lógicas ou descritas por funções (62).

Quando a imagem do microscópio é convertida para imagem digital pela divisão em uma matriz de pixels, estes são arranjados em linhas e colunas, como peças individuais de uma grade. Quanto maior o número de pixels de uma imagem, melhor é o detalhe (resolução) (65).

No estudo de fatores prognósticos, têm sido realizados estudos utilizando os dados morfométricos nucleares associados a outros parâmetros tradicionais. Na próstata, por exemplo, além do já bem documentado valor da avaliação densimétrica (ploídia) como fator prognóstico, o uso de outros descritores matemáticos para o núcleo mostrou ser fator preditivo isolado, bem como associado aos já previamente descritos estágio clínico, escore de Gleason e idade. Tal associação foi capaz de estratificar os pacientes em três grupos, predizendo o tempo de progressão na curva de Kaplan-Meier (66).

Nas lesões escamosas do esôfago, o conteúdo de DNA tem sido tomado como de interesse nas lesões epiteliais não-invasivas, no sentido de fazer predição de sua evolução, separando aquelas lesões que progredirão a carcinoma invasor daquelas que permanecerão estáveis ou regredirão (4).

Estudo realizado em 1989 demonstrou sensibilidade de 100% na discriminação entre epitélio esofágico normal e displásico, utilizando diversos critérios morfométricos, tais como área nuclear na zona superficial, perpendicularidade na zona intermediária, densidade nuclear, dentre outros, com uma especificidade de 96.8% (esta diferença acabou sendo equacionada pela revisão de um caso morfológicamente classificado como displásico que acabou por ser considerado normal) (67).

Para fins didáticos, a análise de imagem pode ser dividida em estágios:

aquisição e transcrição da imagem para o formato digital (videomicroscópio, conversor analógico/digital)

processamento (ou condicionamento) de imagem (correção de problemas de iluminação e óptica do microscópio)

segmentação (determina os elementos ou conjunto de elementos que serão analisados)

extração de características morfométricas e fotométricas (a partir da imagem obtida após a segmentação, o programa de computador faz a extração dos dados)

análise das características (testes estatísticos)

classificação.

Pela segmentação da imagem, os objetos digitalizados de interesse são distinguidos do fundo, utilizando para isso o discernimento humano, por meio de sistemas semi-automatizados, ou pelo uso de tonalidades de cinza atribuídas a cada pixel por meio de instrumentos completamente automatizados. A posição e a

informação ótica de cada pixel na imagem são armazenadas na memória do computador como números que podem ser integrados para cada núcleo ou para todos os núcleos de uma imagem (65).

Baseado nestes princípios, o projeto TICAS (Taxonomic intra-cellular analytic system) da Universidade de Chicago foi criado em 1968, então ainda baseado em fotometria analógica para o estudo de núcleos celulares, descrevendo suas características de densidade ótica, buscando a validação do conceito de que a distribuição da cromatina nuclear segue padrões definidos (68, 69). Para descrever tais padrões, foram criadas características numéricas, cuja validade era testada nos núcleos que compunham os seus bancos de dados. Das mais de 400 características iniciais estudadas em vários órgãos foram selecionadas 93, que passaram a ser aplicadas em outros modelos.

Este novo conjunto de características densimétricas passou a ser designado de assinatura nuclear digital, e suas primeiras publicações surgiram em 1998 (70-72). Nestes estudos foi sugerida a utilização da assinatura nuclear como forma de caracterização específica de núcleos e populações celulares, posto que cada núcleo tem uma assinatura específica.

No nosso meio, o primeiro trabalho utilizando as assinaturas nucleares foi realizado com material de prostatectomias, e foi capaz de detectar alterações das assinaturas em núcleos morfologicamente normais, próximos a lesões precursoras ou áreas de carcinomas (73).

A assinatura nuclear é uma proposta arbitrária de representação gráfica, através de um histograma, dos valores morfométricos, tais como área do núcleo e sua circularidade, e valores de densidade ótica e sua distribuição espacial, conforme a figura 1.

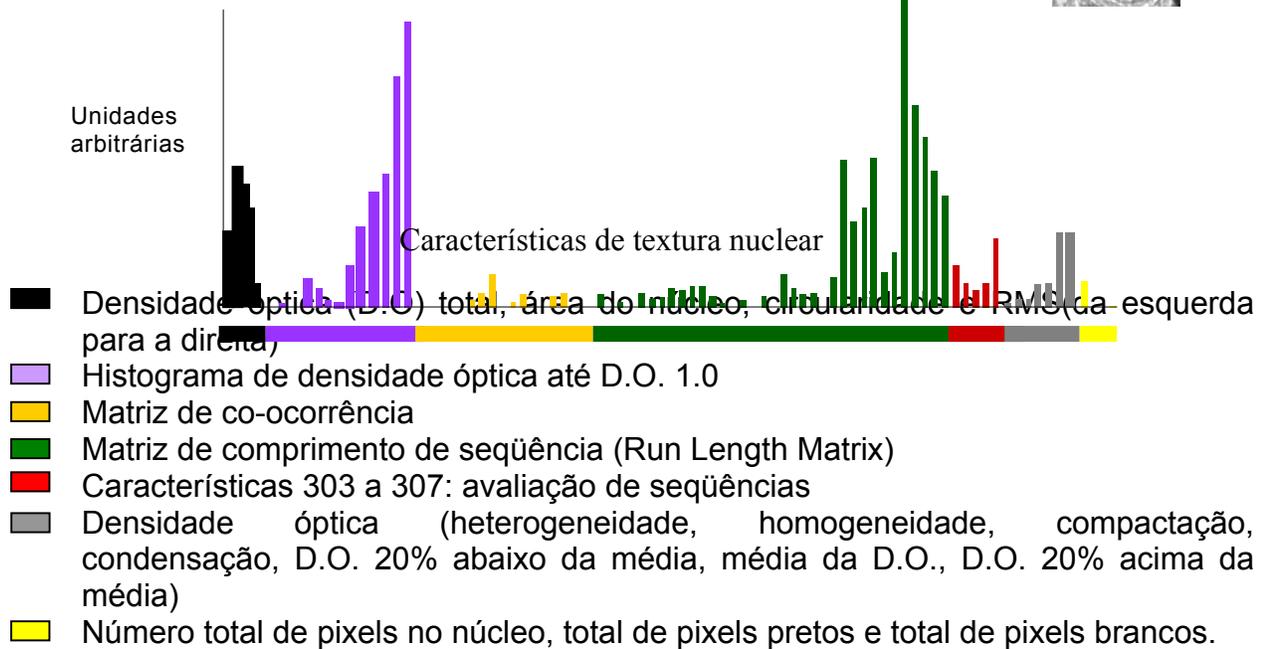
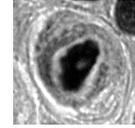


Figura 1. Assinatura nuclear de uma célula epitelial, representada no canto superior direito. As características de descritivas da densidade óptica total, área, circularidade e RMS estão representadas em preto e violeta. As matrizes de co-ocorrência e comprimento de seqüência têm, respectivamente, as cores laranja e verde no histograma. As características representadas em vermelho, cinza e amarelo descrevem a distribuição da densidade óptica e das matrizes de co-ocorrência e comprimento de seqüência. As características são expressas em unidades arbitrárias comparáveis entre si apenas no mesmo grupo de características. As cores utilizadas na figura tem o objetivo de facilitar a compreensão da estrutura das assinaturas nucleares.

As características descritivas da textura da cromatina nuclear foram dispostas de forma arbitrária, sendo inicialmente expressos valores como densidade óptica total e área nuclear, seguidos das frequências relativas de ocorrência de eventos (elementos de imagem) nos intervalos do histograma de densidade óptica e os respectivos desvios padrão. A matriz de co-ocorrência foi disposta após o histograma de densidade óptica. A matriz de comprimento de seqüência (run length matrix) correspondeu ao terceiro grupo de características. Ao final do histograma foram distribuídas as características denominadas conjunto de avaliação de seqüências, densidade óptica e número total de pixels. Essas características sintetizaram as distribuições das características de densidade óptica, co-ocorrência e matriz de comprimento de seqüência através da descrição do formato do histograma de densidade óptica dos elementos de imagem, uniformidade das matrizes e assim por diante. A figura 1 mostra o histograma de uma assinatura nuclear com as ordens de dependência das características de textura nuclear. A assinatura nuclear representa graficamente conjuntos de características de textura de cromatina que permitem ao observador reconhecer padrões e tendências de distribuição de valores. A descrição de cada uma das características está no anexo 3.

A análise de imagem, na medida em que busca alterações subvisuais, como variações de densidade de cromatina e padrões de repetição destas densidades, pode ser útil na tentativa de se determinar quais os pacientes que, frente a um determinado diagnóstico, teriam a necessidade de uma terapêutica mais agressiva.

2. Objetivo

Estudar quantitativamente, pelo método da assinatura nuclear, as características celulares e teciduais de 35 biópsias de epitélios esofágicos, obtidas em Linxian, China, por indicação de estudo citológico prévio pelo balão chinês e que foram classificadas como normais, displasias, ou carcinomas.

3. Material e Métodos

Foram analisadas 35 biópsias obtidas em 1985 na província chinesa de Linxian, de pacientes que, tendo sido submetidos à colheita citológica com balão chinês, tiveram o diagnóstico citológico de displasia. Estes foram submetidos a endoscopia digestiva alta, durante a qual foram feitas biópsias aleatórias do terço médio e distal do esôfago. As biópsias do presente estudo foram escolhidas aleatoriamente, dentro de cada categoria, do banco de casos do Instituto Nacional de Saúde (NIH), Instituto Nacional do Cancer (NCI) dos Estados Unidos

O material foi fixado em formalina neutra a 10%, sendo então submetido a processamento histológico de rotina no Sloan Kettering Cancer Institute em Nova York.

As biópsias, uma vez coradas pelo método de hematoxilina-eosina, foram avaliadas por dois patologistas, com ampla experiência em patologia gastro-intestinal, do NIH, NCI. Os diagnósticos foram agrupados em seis classes: normal, displasia leve, displasia moderada, displasia acentuada, carcinoma suspeito de invasão e carcinoma invasor. Os critérios para tal classificação são os publicados em 1994 (21), e estão detalhados no anexo 1. Outros cortes dos mesmos fragmentos foram corados pelo método de Feulgen, sendo então submetidos à captura e análise de imagem digital por sistema de captura de imagens.

Foi utilizado o sistema de captura de imagens do laboratório de análise de imagens biomédicas do Centro de Ciências Ópticas da Universidade do Arizona em Tucson, EUA, dotado dos seguintes componentes (74):

Elementos ópticos: foram utilizados dois microscópios ópticos convencionais marca Zeiss (Oberkochen, Alemanha) e Leica (Wetzlar, Alemanha), dotados de sistemas de iluminação Koehler, com fontes estabilizadas e reguláveis de luz incandescente e condensadores Abbé com aberturas numéricas de 0,9. O microscópio Leica foi equipado com plataforma de controle automático computadorizado (LANG, Würtemberg, Alemanha) e lente objetiva plano-apocromática de 20 aumentos e abertura numérica (A.N.) de 0.75 (NIKON, Melville, NY, EUA). O microscópio Zeiss foi equipado com objetiva plano-apocromática de imersão em óleo de 63 aumentos (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e abertura numérica de 1.40. Os dois microscópios contavam com fototubos, ótica plana com ampliação de 1x e lentes de projeção com 10 aumentos, determinando resoluções finais de 200 e 630 aumentos, respectivamente.

Dispositivo CCD: foi acoplada uma videocâmara Sony 3 CCD DXC 760 (Sony, Park Ridge, NJ, EUA) ao fototubo do microscópio Leica para captura de imagens com magnificação de 200x. Para captura de imagens de alta resolução foi utilizada uma videocâmara monocromática Vidicon (75) (COHU, San Diego, CA, EUA) acoplada ao microscópio Zeiss. As imagens foram monitoradas durante as sessões de captura através de monitores de vídeo Sony (Park Ridge, NJ, EUA) Trinitron PVM 1954Q com telas de 19 polegadas.

Placas digitalizadoras de imagem: foram utilizadas duas placas de captura DASM-VIP (Analogic Co., Peabody, MA, EUA) de captura estática, gerando quadros de 640 X 480 elementos de imagem, cores de 24 bits (câmara Sony) ou 256 tons de cinza (câmara COHU), sendo estas imagens gravadas em disco rígido com cópias de segurança em CD-ROM gravável. Os arquivos de imagem foram gravados no formato IMA, criado na Universidade de Chicago como parte do projeto TICAS (121), podendo ser convertido em qualquer outro formato convencional, como TIFF (Tagged Image File Format) e JPEG (Joint Photographic Experts Group).

Microcomputadores: As placas de captura de imagem foram conectadas a dois computadores Sun Sparcstation Ultra 2 (Sun Microsystems, Palo Alto, CA, EUA), cada um com 2 processadores RISC de 200 MHz, memória RAM de 1024 MB, discos rígidos de 9 GB e dois monitores de 20 polegadas. O sistema operacional utilizado foi o Sun Solaris versão 2.6. Foi utilizado, também, um microcomputador padrão IBM-PC com processador Intel Pentium II de 450 MHz (Intel, Santa Clara, CA, EUA), 128 MB de memória RAM, disco rígido de 14 GB e monitor de 17 polegadas. O sistema operacional utilizado nesse computador foi o Microsoft Windows 98 (Microsoft, Redmond, WA, EUA). Todos os computadores operaram conectados através de rede.

A metodologia utilizada para extração das características de textura nuclear foi a obtenção de imagens de alta resolução (630x) de 48 a 50 núcleos de cada biópsia, selecionados aleatoriamente em áreas alteradas ou de interesse. As imagens foram então revisadas e arquivadas para extração de características de textura nuclear. A resolução digital foi de seis elementos de imagem por micrômetro.

Análise estatística

A metodologia de análise estatística incluiu os seguintes métodos: análise de variância (ANOVA), método de Kruskal-Wallis e análise de funções discriminantes. A análise de variância foi utilizada para obtenção das médias e desvios-padrão das características cariométricas nucleares individuais e das populações celulares. O método de Kruskal-Wallis (76) selecionou as características que ofereceram melhor discriminação entre as categorias diagnósticas estudadas para a análise de variância (77). E a última foi aplicada para obtenção das curvas de progressão das diferentes categorias diagnósticas.

Com o intuito de diminuir o número de categorias para análise, os casos suspeitos de invasão e carcinomas invasores foram colapsados em um mesmo grupo.

4. Resultados

Os 35 casos foram classificados segundo os critérios publicados em 1994 (40), e detalhados no anexo 1. Foram diagnosticados 8 casos normais, 6 displasias leves, 8 displasias moderadas, 4 displasias acentuadas, 4 carcinomas suspeitos de invasão e 5 carcinomas invasores. Para fins de avaliação cariométrica, os casos suspeitos de invasão e os carcinomas invasores foram colapsados em uma mesma categoria. O anexo 2 mostra a numeração seqüencial utilizada no presente estudo, a numeração do protocolo do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), as categorias diagnósticas às quais cada caso corresponde bem como o valor médio de assinatura obtido, definido como a média aritmética dos valores de todas as características cariométricas estudadas.

As figuras 2 a 6 apresentam as assinaturas nucleares digitais de cada caso, com o valor médio da assinatura no canto direito de cada histograma. A figura 7 apresenta os histogramas com as médias aritméticas dos valores para cada categoria diagnóstica.

Normal

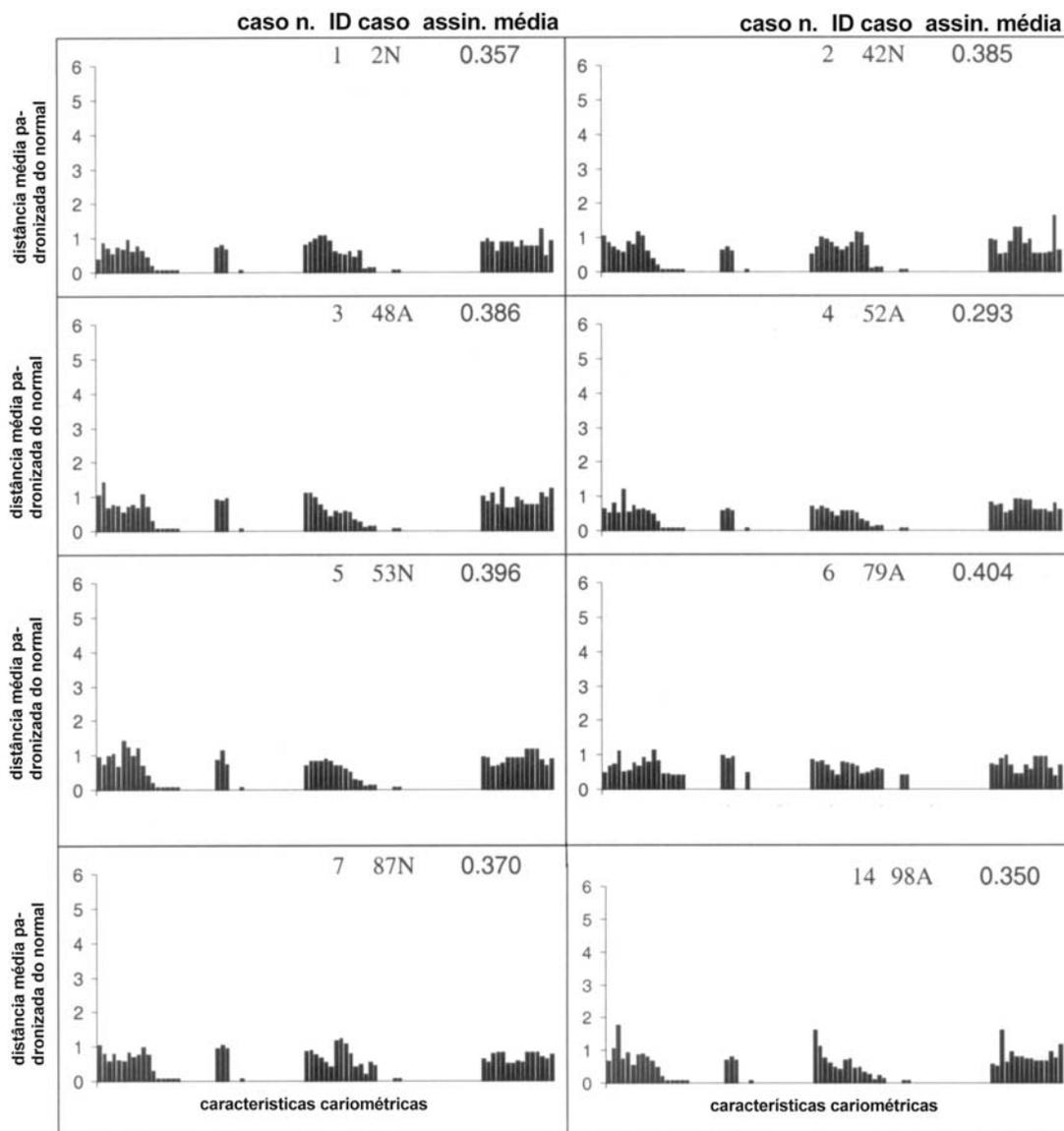


Figura 2. Assinaturas nucleares digitais dos casos classificados como normais.

Displasia leve

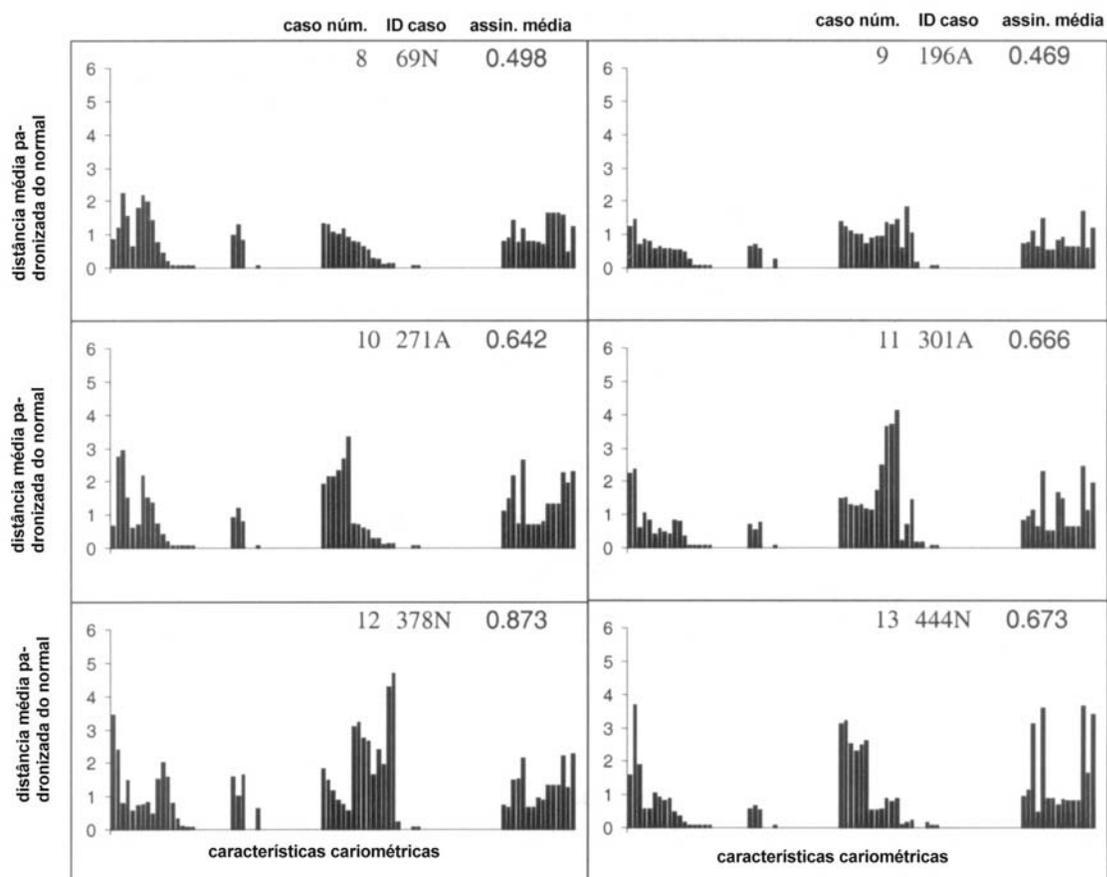


Figura 3. Assinaturas nucleares digitais dos casos classificados como displasia leve.

Displasia moderada

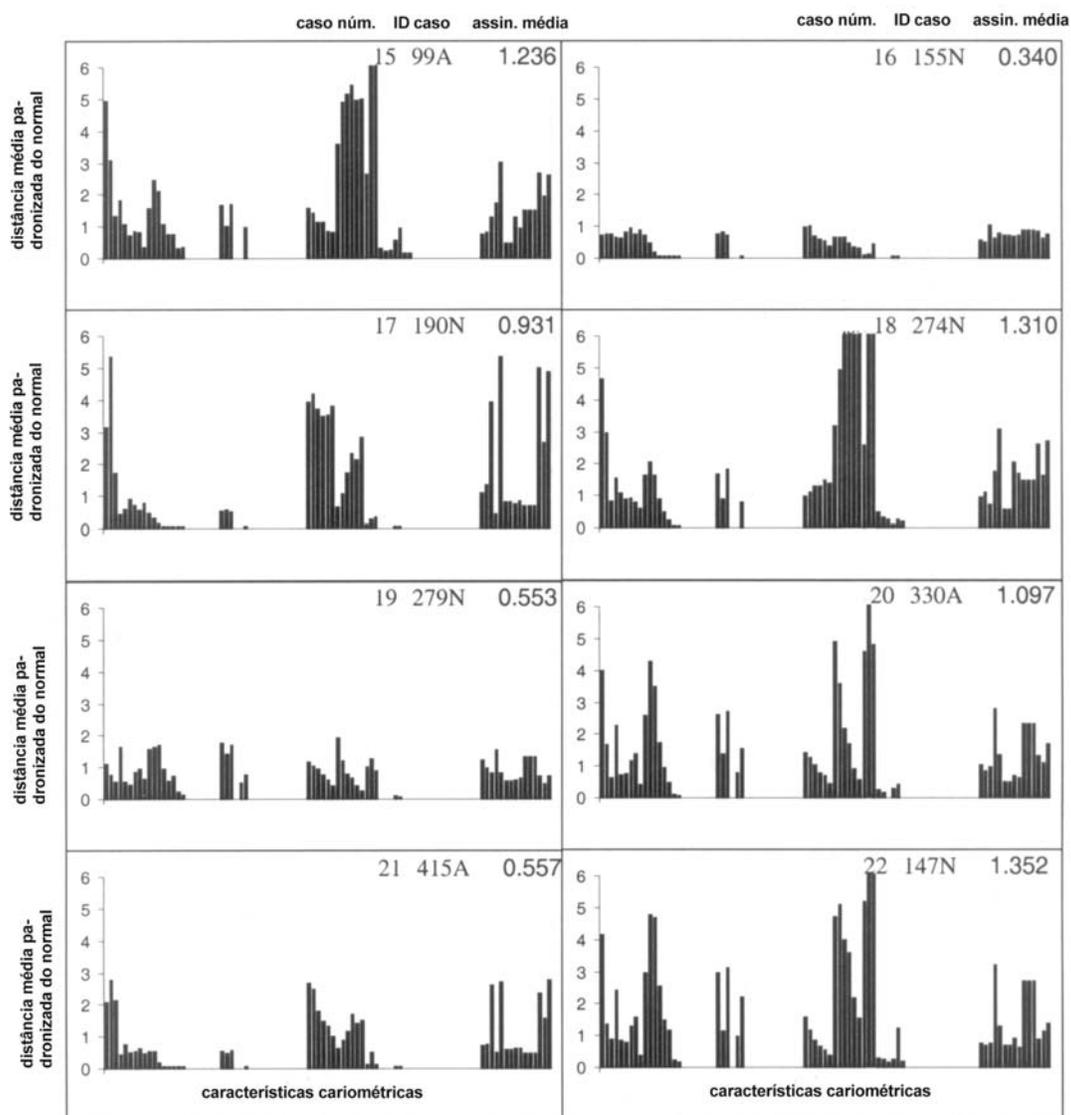


Figura 4. Assinaturas nucleares digitais dos casos classificados como displasia moderada.

Displasia acentuada

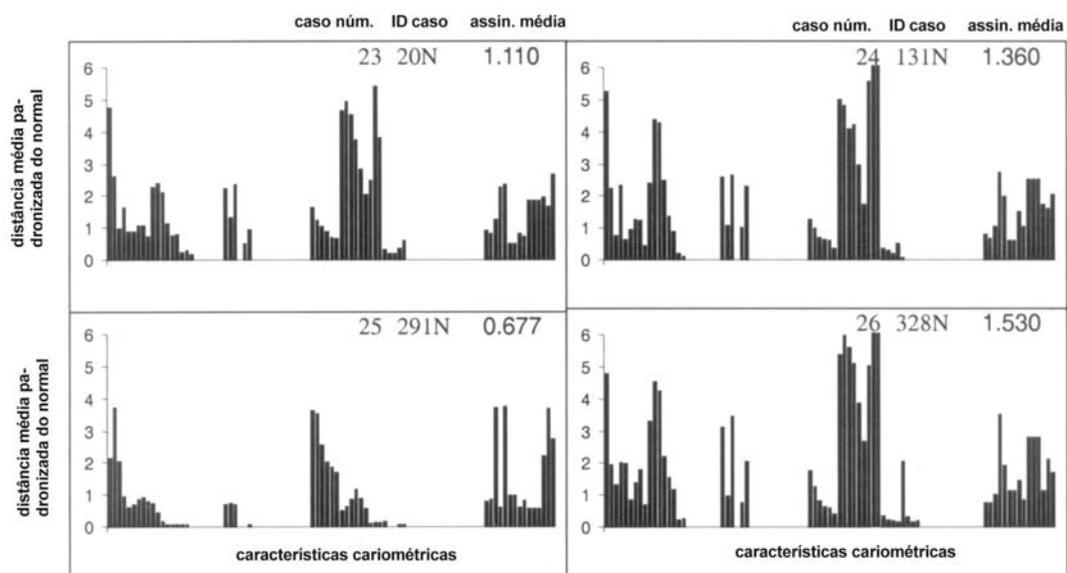


Figura 5. Assinaturas nucleares digitais dos casos classificados como displasia acentuada.

Carcinoma escamoso

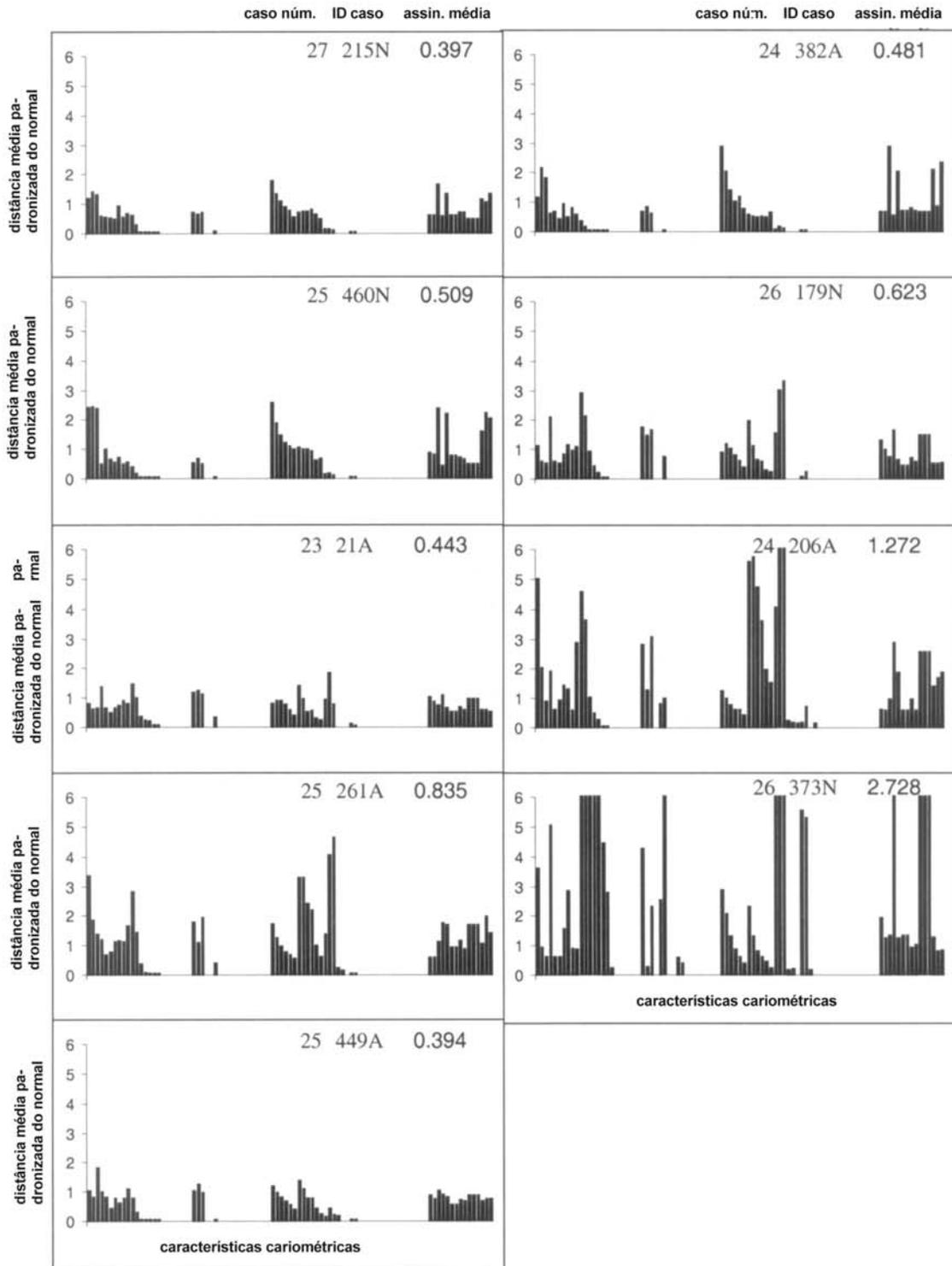


Figura 6. Assinaturas nucleares digitais dos casos classificados como carcinoma epidermóide.

Outra possibilidade de apresentação, mais adequada para a representação das médias aritméticas dos valores de assinaturas nucleares distribuídas nos cortes histológicos examinados é o histograma denominado assinatura de padrão histológico. Este histograma, caracterizando cada categoria diagnóstica está representado na figura 7. Os dados estão distribuídos em 25 intervalos ao longo do eixo x e o eixo y exibe a frequência de ocorrência das médias aritméticas das assinaturas em valores percentuais. Quanto maior a distância no eixo x, maior o grau de anormalidade nuclear.

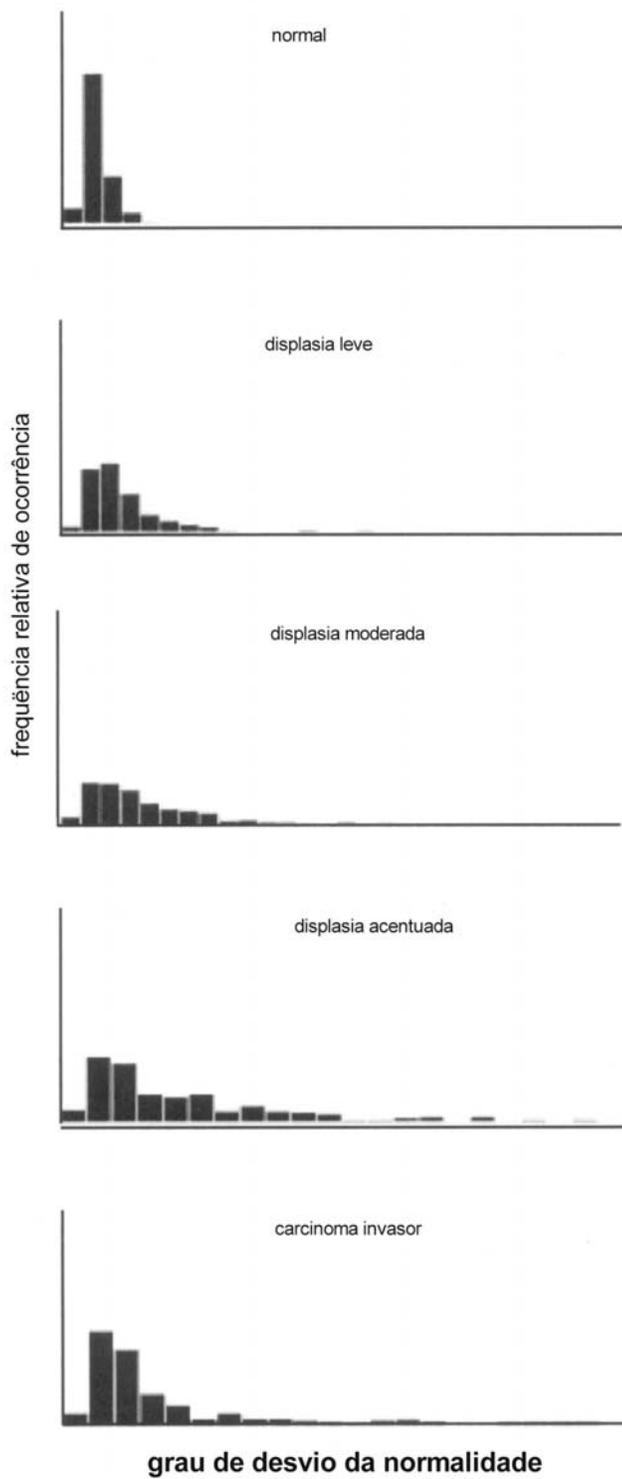


Figura 7. Assinaturas de padrão histológico das categorias diagnósticas.

A figura 8 apresenta a densidade óptica total de cada categoria diagnóstica, onde se pode observar o histograma da categoria diagnóstica normal com quatro barras verticais. A primeira barra, de pequeno valor, representa núcleos celulares seccionados pelo micrótopo em diversas alturas, apresentando portanto densidades ópticas menores que as duas colunas intermediárias, que correspondem à população celular de valor euplóide.

A análise estatística inferencial foi realizada através da seleção de quinze características que apresentavam maior discriminação entre o grupo de casos normais e o grupo dos carcinomas. Esta seleção foi realizada através do método de Kruskal-Wallis.

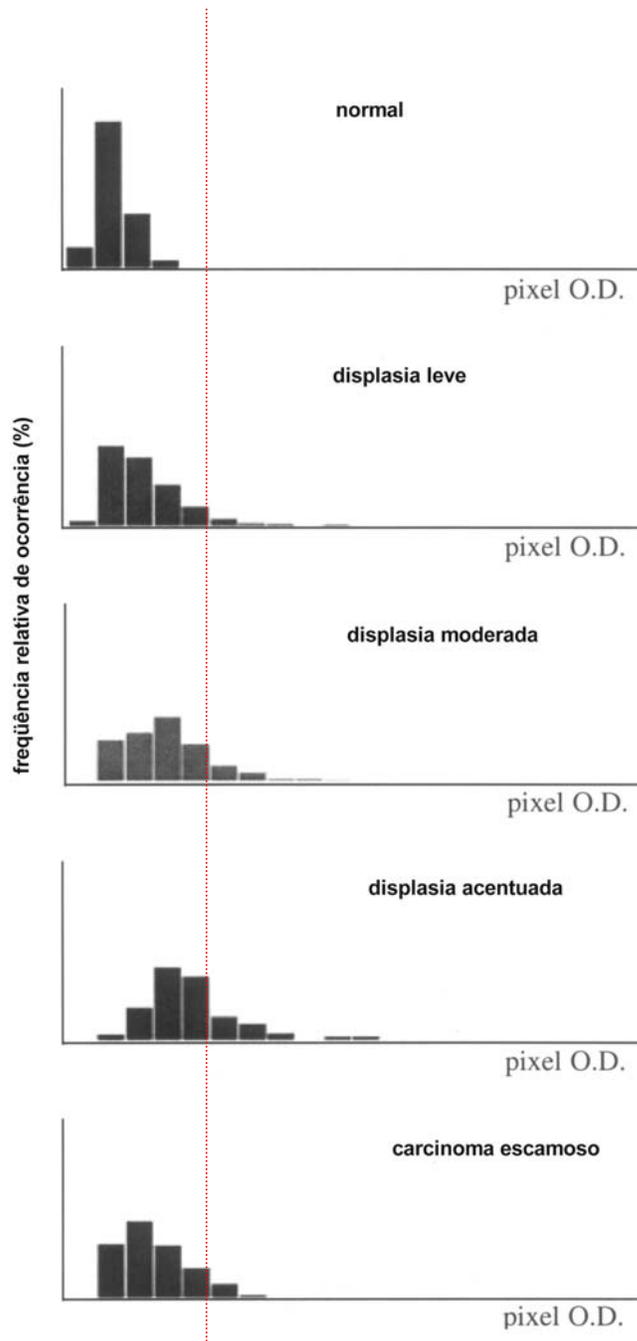


Figura 8. Histogramas da densidade óptica total das categorias diagnósticas. A linha tracejada em vermelho representa a referência da população euplóide (2N).

A partir da seleção destas características, foi realizada análise de funções discriminantes utilizando as características previamente selecionadas. Os resultados da análise de funções discriminante são representados na figura 9, junto com os valores de densidade óptica total de cada categoria diagnóstica e seus intervalos de confiança, apresentados na tabela I. O valor da função discriminante para a categoria normal teve resultado negativo, o que reflete a significativa diferença entre essa categoria diagnóstica e as categorias representativas de processos patológicos.

Por fim, os histogramas com as duas características cariométricas que ofereceram melhor discriminação entre os grupos diagnósticos são representados nas figuras 10 e 11, e os dados são discriminados nas tabelas II e III. É interessante observar a elevação contínua dos valores de tais características ao longo da progressão das lesões rumo ao carcinoma, com a redução dos valores nesta categoria diagnóstica.

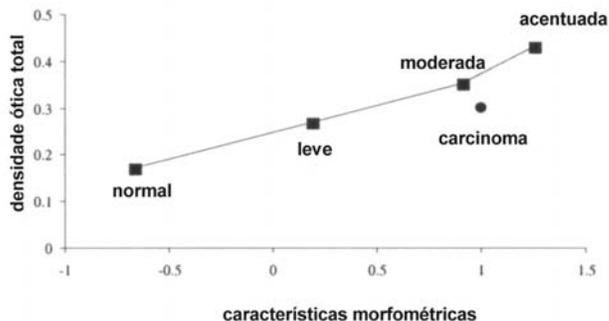


Figura 9. Análise de funções discriminante e os valores de densidade óptica total de cada categoria diagnóstica, apresentados na tabela I.

Tabela I. Funções discriminantes e densidade óptica por categoria diagnóstica.

Categoria	Valor da função discriminante	D.O.T.
Normal	-0,67	0,171
Displasia leve	0,188	0,269
Displasia moderada	0,908	0,353
Displasia acentuada	1,255	0,432
Carcinoma epidermóide	0,512	0,302

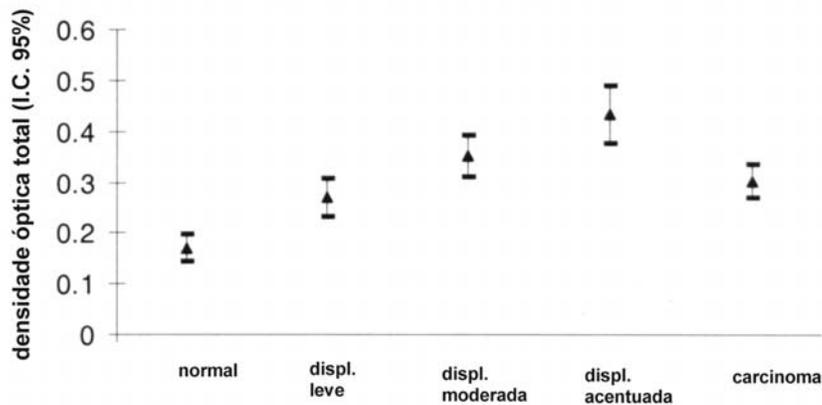


Figura 10. Valores de densidade óptica total de cada categoria diagnóstica e seus intervalos de confiança, apresentados na tabela II.

Tabela II. Valores de densidade óptica total por categoria diagnóstica e seus intervalos de confiança.

Categoria	Densidade óptica total	I.C. 95%
Normal	0,171	0,026
Displasia leve	0,27	0,037
Displasia moderada	0,353	0,041
Displasia acentuada	0,432	0,056
Carcinoma epidermóide	0,302	0,033

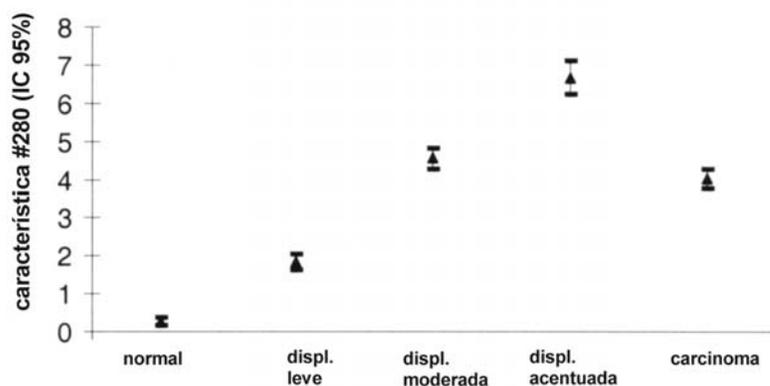


Figura 11. Valores de matriz de comprimento de seqüência de cada categoria diagnóstica e seus intervalos de confiança, apresentados na tabela III.

Tabela III. Matriz de comprimento de seqüência por categoria diagnóstica e seus intervalos de confiança.

Categoria	Densidade óptica total	I.C. 95%
Normal	0,255	0,104
Displasia leve	1,841	0,226
Displasia moderada	4,546	0,282
Displasia acentuada	6,67	0,43
Carcinoma epidermóide	4,017	0,260

5. Discussão

A anatomia patológica tem se baseado por mais de 150 anos na avaliação visual de células e tecidos através da microscopia óptica convencional. Utilizando tais métodos, essa especialidade alcançou elevado nível de desempenho. No estudo de casos, os patologistas baseiam-se em suas experiências profissionais, que abrangem imagens mentais e conhecimentos de histologia, alterações histopatológicas macro e microscópicas, prognóstico de pacientes e respostas possíveis a intervenções terapêuticas. A integração desse conhecimento implica no uso extenso de informações não oferecidas por imagens microscópicas. Portanto, a anatomia patológica é uma disciplina multifacetada e seu desempenho é, em grande parte, dependente da integração de conhecimento clínico, etiopatogênico e epidemiológico ao reconhecimento de padrões em imagens macro e microscópicas. Além disso, o conhecimento diagnóstico existente é individual e por consequência, não permanente. Além desses aspectos, existem situações onde a avaliação visual tem desempenho excelente e outras onde esse método não é confiável ou mesmo aplicável. Essas particularidades tornam atraente a exploração das possibilidades da imagética digital associada a outras informações não-visuais.

Esse estudo foi desenhado basicamente para a demonstração da viabilidade do método no estudo das neoplasias malignas de esôfago. Projetos mais amplos utilizando número maior de casos serão necessários, sendo particularmente interessante a aplicação conjugada de microdissecção a laser, estudos de cortes seriados em espécimes de esofagectomia e métodos de biologia molecular.

A metodologia envolvida não exige alterações das técnicas de biópsia de órgãos ou tecidos, tais como aumento do volume de tecido amostrado, do tempo de realização dos procedimentos ou aumento de risco desses. Pode ainda ser aplicada a qualquer material histológico fixado em formalina neutra a 10 % ou álcool sem implicar em modificação de técnicas de processamento histológico e coloração.

As lâminas avaliadas no presente trabalho representam cortes dos mesmos blocos a partir dos quais foram feitos os preparados em que foi dado o diagnóstico primário. É sabido, entre os patologistas, que diferentes cortes de um mesmo fragmento podem exibir uma variação entre si. Ou seja, uma determinada lesão pode aparecer nas primeiras lâminas e não fazê-lo nas seguintes, ou, pelo contrário, ser evidente ou mais grave apenas nos cortes mais profundos do mesmo bloco. Este é um dos potenciais vieses deste trabalho: os diagnósticos pelos quais os casos foram agrupados foram efetuados em cortes de uma altura bem diferente do bloco em relação àqueles que foram corados pelo método de Feulgen, podendo a lesão, portanto, estar representada de uma forma significativamente diversa da interpretação inicial. Considerando que não seria possível realizar o presente estudo utilizando os cortes iniciais, a solução óbvia pareceria ser descorar as lâminas que foram coradas pelo método de Feulgen (já

que este não se presta para avaliação rotineira de microscopia convencional), e reagrupar os casos segundo a leitura feita a partir destas mesmas lâminas. Esbarra-se, no entanto, em primeiro lugar, na variabilidade interobservador, posto que os pesquisadores que efetuaram os primeiros diagnósticos não estão em nosso meio para realizar esta nova leitura. Outro fator dificultante da resolução deste potencial viés é a própria variabilidade intra-observador. Entre o primeiro diagnóstico e a realização do presente estudo passaram-se cerca de 15 anos. Conseqüentemente, a vivência diagnóstica de ambos os observadores, mesmo sendo ampla naquele primeiro momento, obviamente foi acrescida de novas experiências, o que também, potencialmente, influiria nos diagnósticos atuais.

Para ilustrar o quanto estes dois fatores (a variabilidade intra-observador e a diferença de altura de corte do bloco de parafina), somados às diferenças de classificação, podem afetar a categorização diagnóstica, solicitou-se a um dos observadores iniciais a leitura das lâminas utilizadas no atual trabalho, descoradas e recoradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). Neste momento, os 35 casos foram classificados em normal/reactivo, displasia de baixo grau, displasia de alto grau, displasia de alto grau com possível invasão e carcinoma invasor. O resultado desta nova avaliação, juntamente com a classificação inicial, está no anexo 2. Apesar de não ser possível medir o peso de cada uma das variáveis (as diferentes alturas de corte do bloco, a variabilidade intra-observador e os diferentes sistemas classificatórios), as diferenças são óbvias.

Por outro lado, considerando a metodologia da análise de imagem, é necessário considerar-se a possibilidade de efeito de campo, discutida mais adiante, que baseia-se nas evidências de que as alterações sutis de padrão de cromatina podem estar presentes em distâncias variáveis da lesão, o que mantém a validade das mensurações como método de avaliação de biópsias.

As assinaturas nucleares dos casos normais no presente estudo apresentaram valores e desvios-padrão pequenos, refletindo características morfométricas de uma população celular homogênea e com diferenças estatisticamente significativas das demais categorias diagnósticas estudadas. As tendências observadas nas assinaturas nucleares a partir das células normais até as displasias acentuadas reproduzem resultados observados em outros trabalhos (71, 72), onde apenas as características que ofereciam discriminação entre categorias diagnósticas foram utilizadas para classificação de núcleos celulares. O presente estudo seguiu a metodologia descrita por da Silva (73), com seleção irrestrita de características para identificação específica e individual de núcleos e lesões com o propósito de apresentação visual de casos individuais e diferentes categorias diagnósticas através das assinaturas digitais, utilizando todas as características de textura nuclear disponíveis, e não apenas aquelas que oferecessem maior grau de discriminação entre categorias. As diferenças sutis de expressão de características redundantes podem conter as informações necessárias para a correta identificação de núcleos ou lesões, o que é um procedimento diferente das metodologias de classificação existentes, baseadas em morfologia clássica. O pressuposto aqui apresentado é que essas diferenças não se devam apenas a aleatoriedade e variações entre pacientes, mas também a diferenças reais e mensuráveis dos núcleos e lesões estudados.

Os casos de carcinoma epidermóide de esôfago apresentaram reduções da densidade óptica total e dos valores da matriz de comprimento de seqüência em relação à população das áreas de displasia acentuada, apresentando valores sobrepostos aos das displasias moderadas. Este tipo de comportamento já foi previamente descrito em lesões glandulares como na próstata e no próprio esôfago, em casos de esôfago de Barrett (72, 73, 78).

A coloração de Feulgen é estequiométrica e específica para DNA. Porém, a microfotometria do DNA com essa coloração e outros métodos estequiométricos em cortes histológicos apresenta restrições, já que existem vários protocolos diferentes para a reação de Feulgen, com variações na formulação de corantes e tempo de hidrólise do material. Até mesmo a fixação pode alterar os resultados da técnica (79). Porém o advento de kits comerciais de coloração de Feulgen, como o da Merck (Merck, Darmstadt, Alemanha) poderá diminuir tais variações. Além disso, os procedimentos fundamentais para calibração de videofotômetro através de filtros de densidade neutra e o uso de fontes estabilizadas de alimentação não são aplicados corretamente em vários laboratórios. Mesmo que esses aspectos venham a ser padronizados, existem outros problemas, como os relacionados a núcleos parcialmente seccionados, que tendem a produzir valores hipodiplóides nos histogramas de densidade óptica total. Na tentativa de solucionar esta questão surgiram propostas de algoritmos como o de McCready (80), que assume que núcleos são esféricos e que o DNA tem distribuição uniforme por todo núcleo celular, premissas que demonstram a impossibilidade de tal algoritmo solucionar a questão. Além disso, a lei de Lambert-Beer foi estabelecida para situações similares aos pressupostos do algoritmo de McCready, onde existe a distribuição homogênea de corante, o que não acontece nos núcleos celulares e é particularmente notável em aumentos de 400 vezes ou mais. Todas essas limitações reforçam a cautela na interpretação dos valores de densidade óptica total como parâmetros na avaliação de núcleos celulares mesmo por técnicas estequiométricas. As assinaturas nucleares digitais, por oferecerem a avaliação de vários parâmetros derivados da densidade óptica e relacionados também com a distribuição espacial da cromatina, podem reduzir o impacto de tais restrições. Além disso, uma série de publicações começa a surgir a partir do Centro de Ciências Ópticas do Arizona (Tucson, EUA) (70, 73, 78, 81), o que permitiu a padronização de metodologia de obtenção de perfis de caracterização cariométrica de núcleos celulares e sua introdução em nosso meio.

Foi observado um aumento progressivo dos valores da matriz de comprimento de seqüência em algumas faixas de densidade óptica da categoria normal até a displasia acentuada, seguido de redução do valor desta característica no carcinoma, comportamento observado em trabalhos anteriores (73, 78, 82). A tradução morfológica desta característica morfométrica é a textura da cromatina, do mais homogêneo e menos grumoso (como observado em núcleos normais) ao mais grosseiro e grumoso, como observado nas displasias acentuadas (83) (a descrição da característica está no anexo 3). Não existe, até o momento, justificativa satisfatória na literatura para esse achado, sendo a hipótese de maior sustentação até o presente o possível relaxamento estrutural da cromatina

relacionado às alterações das histonas que ocorrem nos processos de transformação neoplásica (84). Sendo a morfologia da célula o produto de um sistema complexo e ainda pouco compreendido que integra a matriz extracelular, o citoesqueleto e a matriz nuclear (85), começam a surgir também evidências de que a expressão gênica altera e é também modificada na interação com a estrutura tridimensional das células (84). Sinais mecânicos (86) e químicos são transmitidos ao núcleo celular, produzindo modificações na organização tridimensional da cromatina (87, 88). As vias de transdução desses sinais seriam, possivelmente, as responsáveis pela modificação das histonas através da fosforilação e acetilação (89), conferindo-lhes as alterações descritas.

Alterações morfométricas e densimétricas podem refletir as alterações cumulativas do genoma celular causadas pela instabilidade genética. E as alterações genéticas conhecidas mais frequentemente relacionadas a neoplasias malignas podem ser agrupadas em (90): alterações sutis de seqüência de pares de bases, translocações cromossômicas, alterações no número de cromossomos e ampliações de genes. Após duas décadas de extensa investigação, no entanto, os mecanismos determinantes da instabilidade genética permanecem desconhecidos (91-93). A hipótese predominante é de que mutações ainda desconhecidas determinariam a instabilidade genética e que algumas mutações subsequentes levariam à progressão tumoral (92).

A análise de imagem de padrões de cromatina tem demonstrado alterações estatisticamente significativas em núcleos celulares muito antes destas se tornarem visíveis ao estudo por microscopia óptica convencional. Tal capacidade de caracterizar núcleos pode fornecer uma conexão entre a morfologia nuclear das lesões neoplásicas intraepiteliais, carcinomas epidermóides e a detecção de eventos moleculares por métodos da biologia molecular que sirvam como marcadores em estágios ainda mais precoces. A interpretação com base em tais padrões pode ser mais consistente do que predições baseadas em um ou dois biomarcadores envolvidos em um sistema complexo de múltipla retroalimentação. A necessidade de aplicar conceitos relacionados a sistemas complexos no estudo genético do câncer e dos fenótipos tumorais é sustentada pela própria instabilidade genética. A maior parte das neoplasias malignas é originalmente clonal, derivando de uma única célula (94) mas, ao mesmo tempo, altamente heterogênea, ou seja: policlonal com respeito aos cariótipos e fenótipos de células individuais (95-97), pelo surgimento de clones secundários na evolução da neoplasia. A integração de informações de modificações moleculares com alterações morfológicas subvisuais pode contribuir na detecção e avaliação prognóstica de eventos precursores e de neoplasias.

As assinaturas nucleares baseadas em distâncias padronizadas da população normal fornecem a caracterização imediata de um único núcleo ou conjunto de núcleos celulares para avaliação visual de diferenças, similaridades e tendências. O próximo estágio de desenvolvimento dessa metodologia será a utilização das assinaturas digitais para identificação positiva de núcleos com relação a malignidade, o que dependerá também do advento de metodologia de análise que considere a variabilidade devida à incerteza de conceitos imprecisos, tais como as descrições de alterações morfológicas em anatomia patológica e interações em

sistemas complexos, caracterizadas por retroalimentação em múltiplos níveis. A emergência de técnicas adequadas será fundamental para desenvolvimento de uma medida de certeza de que um núcleo de fato representa claramente um processo patológico e o quanto cada característica cariométrica contribui para a medida de certeza final. Atualmente, os sistemas especialistas podem ser uma alternativa interessante para esse fim.

Outra aplicação possível das assinaturas digitais é no desenvolvimento de um biomarcador substituto (SEBM, ou surrogate endpoint biomarker) (98). Para isso, dois aspectos são fundamentais: determinar as propriedades que tal biomarcador deve possuir e a etapa do processo de progressão oncogênica que este marcador deve sinalizar. Um biomarcador efetivo deve necessariamente permitir a detecção da progressão tumoral. Isso aponta para entidades mensuráveis, que permitam o desenvolvimento de escalas numéricas. Ao mesmo tempo, o procedimento de amostragem deve ser minimamente invasivo e permitir repetidas avaliações com custo mínimo. Além disso, tal índice de progressão deve admitir a representação da reversibilidade de características, permitindo avaliar não apenas a progressão, mas também a estabilização e regressão de lesões, o que torna o marcador útil para estudos de intervenção com agentes quimiopreventivos.

6. Conclusões

O presente estudo demonstrou a viabilidade da quantificação de características celulares e teciduais do epitélio esofágico através das assinaturas nucleares digitais, pois permitiu:

a caracterização de diferenças estatisticamente significativas entre os núcleos normais e núcleos displásicos e neoplásicos.

O estabelecimento de um padrão de distribuição progressiva de algumas características relacionada ao grau de displasia das lesões precursoras do carcinoma epidermóide de esôfago, sendo a densidade óptica total do núcleo e a matriz de comprimento de seqüência as de maior significância estatística.

A definição de um grupo de 15 características cariométricas capaz de estabelecer, através de análise de funções discriminantes, uma curva de progressão relacionada ao grau de displasia.

Anexo 1

Crêterios histológicos de classifica o

1. Normal: ep t lio escamoso estratificado bem orientado, com uma zona basal e uma zona superficial, como ou sem lâmina própria subjacente. A zona basal   definida como incluindo as células da lâmina basal até onde os núcleos sejam separados por um diâmetro nuclear. A zona superficial, incluindo todo o ep t lio acima da zona basal,   composto por células escamosas que vão se achatando na medida em que chegam   superfície.

2. Displasia: atipia nuclear (aumento do tamanho, pleomorfismo e hipercromasia, perda de polaridade e maturac o tecidual, sem invasão das células epiteliais através da membrana basal. Na displasia leve, estas anormalidades estão confinadas ao terço inferior do ep t lio; na displasia moderada, elas estão presentes nos dois terços inferiores do ep t lio; na displasia severa elas envolvem também o terço superficial do ep t lio. O envolvimento de toda a espessura do ep t lio, o chamado carcinoma "in situ", foi incluído na classifica o de displasia severa.

3. Carcinoma epidermóide: identifica o de células escamosas neoplásicas que invadiram a membrana basal.

Quando a lesão estava confinada   lâmina própria ou muscular da mucosa, foi chamado de carcinoma intra-mucoso ou carcinoma precoce. (40)

Anexo 2

Tabela I. Identificação dos casos, categorias diagnósticas e valores de assinatura nuclear média por caso.

Protocolo (numeração)	Categoria diagnóstica	Assinatura média
2N (sq 1)	Normal	0,357
20N (sq 23)	Displasia acentuada	1,110
42N (sq 2)	Normal	0,385
48A (sq 3)	Normal	0,386
52A (sq4)	Normal	0,293
21A (sq 32)	Carcinoma invasor	0,443
53N (sq 5)	Normal	0,396
69N (sq 9)	Displasia leve	0,498
79A (sq 6)	Normal	0,404
87N (sq 8)	Normal	0,370
99A (sq 15)	Displasia moderada	1,236
98A (sq 37)	Normal	0,350
131N (sq 24)	Displasia acentuada	1,360
147N (sq 22)	Displasia moderada	1,352
155N (sq 16)	Displasia moderada	0,340
196A (sq 10)	Displasia leve	0,469
190N (sq 17)	Displasia moderada	0,931
179N (sq 31)	Carcinoma invasor	0,623
206A (sq 33)	Carcinoma invasor	1,272
215A (sq 28)	Carcinoma invasor	0,397
271A (sq 11)	Displasia leve	0,642
274N (sq 18)	Displasia moderada	1,310
261A (sq 34)	Carcinoma invasor	0,835
279N (sq 19)	Displasia moderada	0,553
301A (sq 12)	Displasia leve	0,666
291N (sq 26)	Displasia acentuada	0,667
330A (sq 20)	Displasia moderada	1,097
328N (sq 27)	Displasia acentuada	1,530
378N (sq 13)	Displasia leve	0,873
373N (sq 35)	Carcinoma invasor	2,728
382A (sq 29)	Carcinoma invasor	0,481
415A (sq 21)	Displasia moderada	0,557
444N (sq 14)	Displasia leve	0,673
449A (sq 36)	Carcinoma invasor	0,394
460N (sq 30)	Carcinoma invasor	0,509

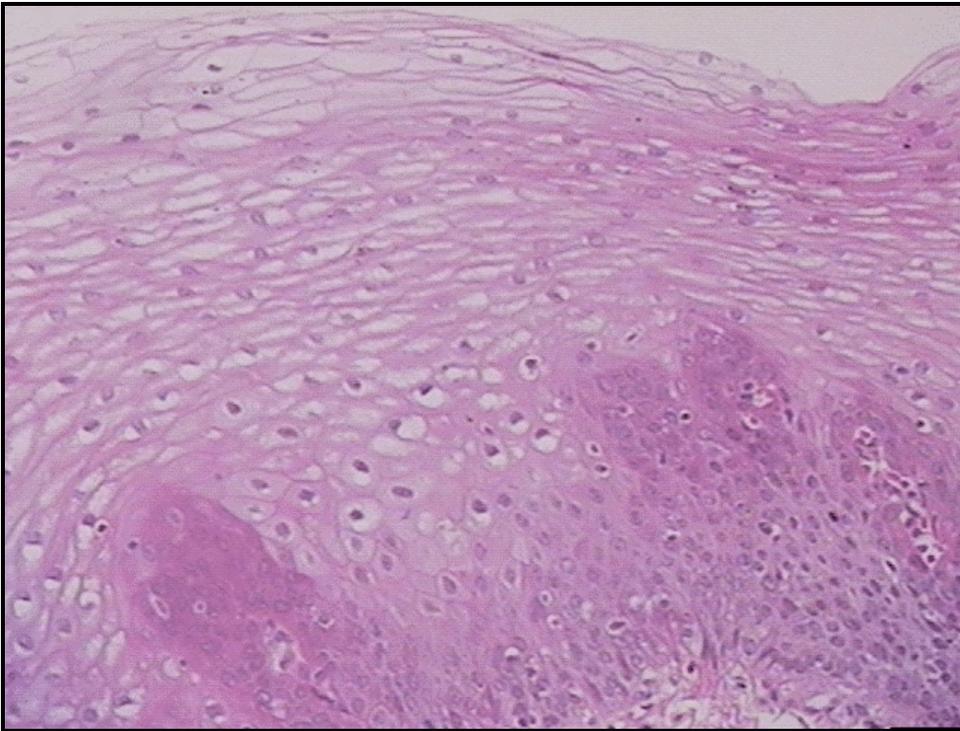


Figura 1. Biópsia normal (HE, 100X).

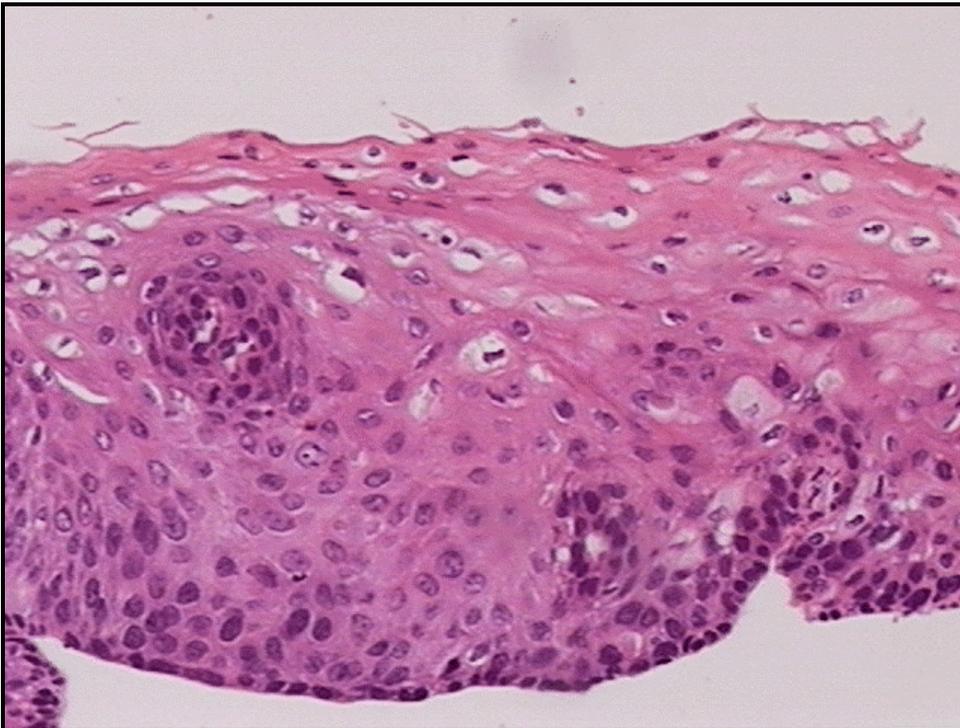


Figura 2. Displasia leve (HE, 100X).

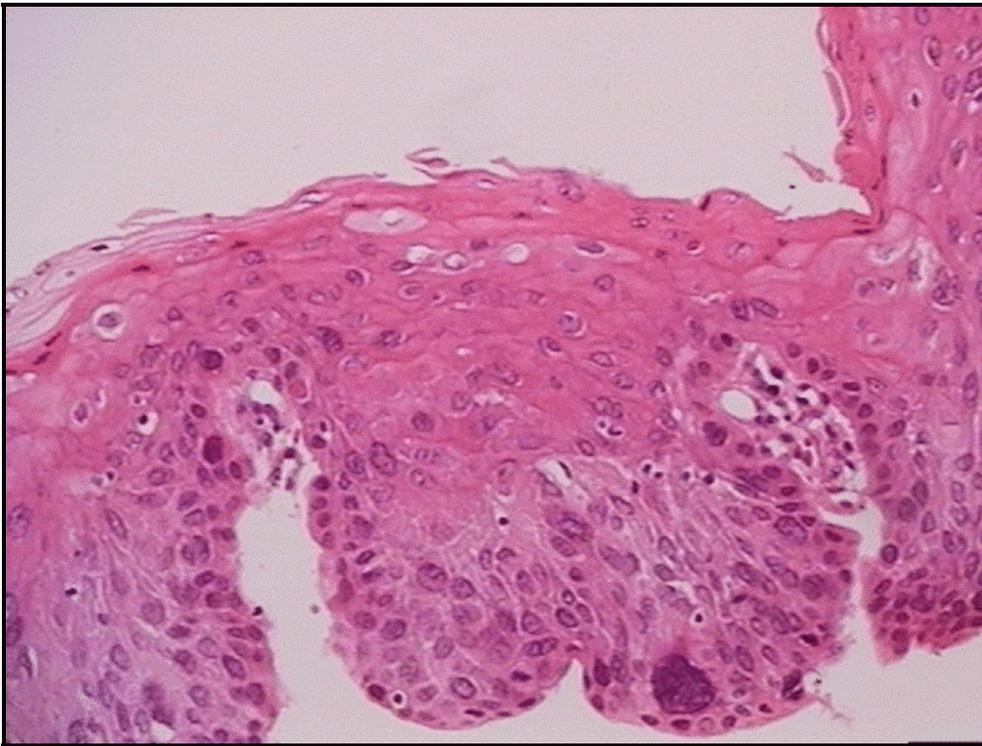


Figura 3. Displasia moderada (HE, 100X).

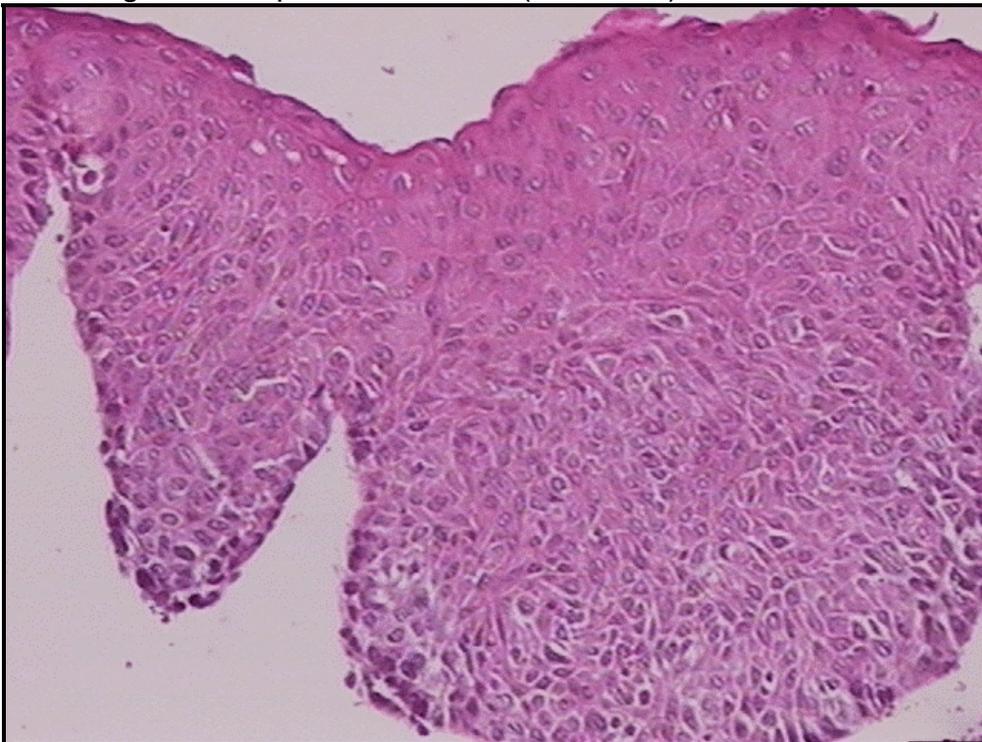


Figura 4. Displasia acentuada (He, 100X).

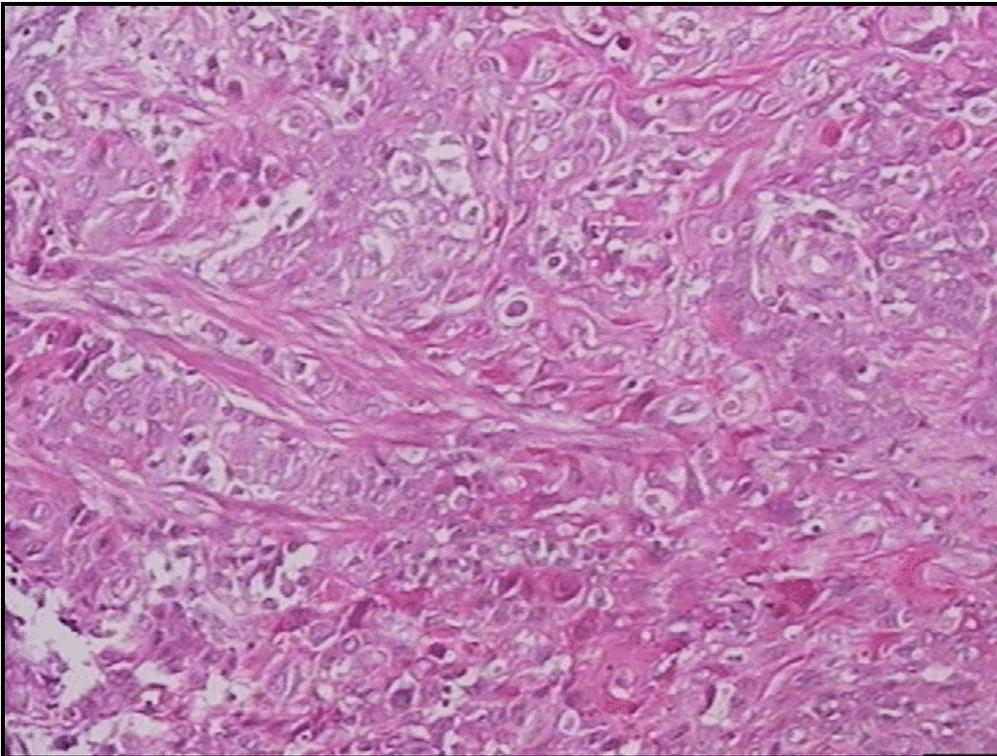


Figura 5. Carcinoma invasor (HE, 100X)

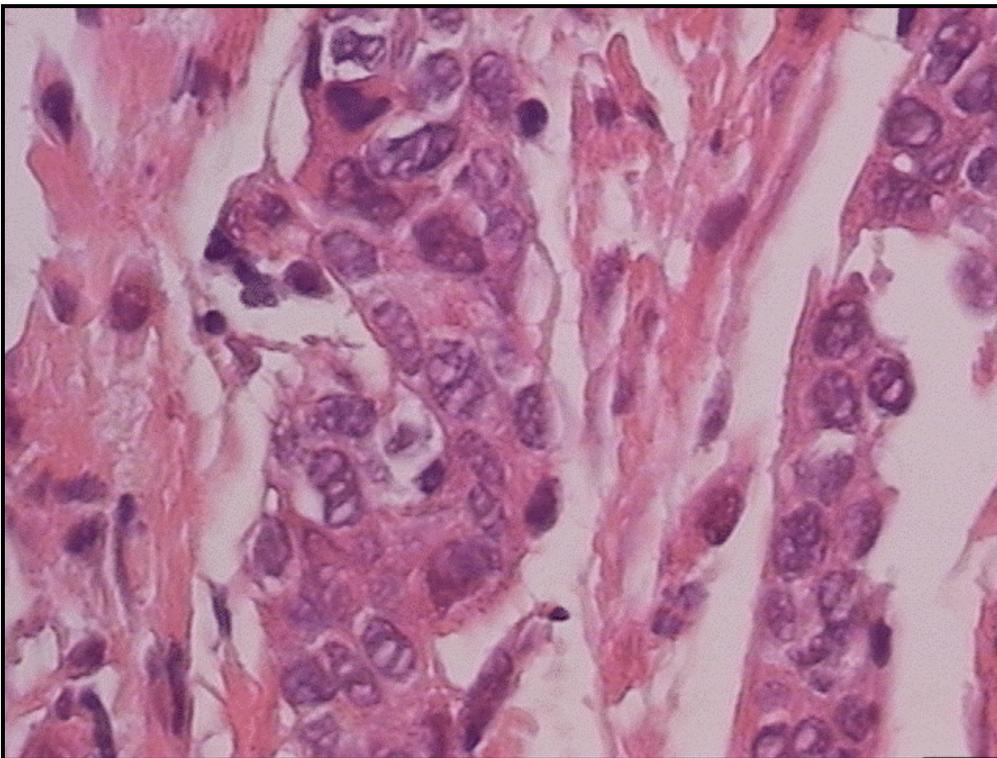


Figura 6. Carcinoma invasor (HE, 400X).

Tabela II. Comparação entre o diagnóstico histológico inicial (Diagnóstico 1) e o diagnóstico efetuado nas mesmas lâminas onde foram realizadas as medidas cariométricas (Diagnóstico 2).

NÚMERO DO CASO	DIAGNÓSTICO 2	DIAGNÓSTICO 1
2N	Normal	Normal
20N	Alto grau	Displasia acentuada
21A	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor
42N	Normal	Normal
48A	Normal	Normal
52A	Normal	Normal
53N	Normal	Normal
69N	Normal	Displasia leve
79A	Normal	Normal
87N	Indefinido	Normal
98A	Normal	Normal
99A	Baixo grau	Displasia moderada
131N	Alto grau (suspeito de invasão)	Displasia acentuada
147N	Alto grau	Displasia moderada
155N	Normal	Displasia moderada
179N	Alto grau	DA / SI *
190N	Baixo grau	Displasia moderada
196A	Normal	Displasia leve
206A	Alto grau (suspeito de invasão)	Carcinoma invasor
215A	Alto grau	DA / SI *
261A	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor
271A	Baixo grau	Displasia leve
274N	Alto grau	Displasia moderada
279N	Normal	Displasia moderada
291N	Alto grau	Displasia acentuada
301A	Baixo grau	Displasia leve
328N	Alto grau	Displasia acentuada
330A	Baixo grau	Displasia moderada
373N	Alto grau (suspeito de invasão)	Carcinoma invasor
378N	Baixo grau	Displasia leve
382A	Alto grau	DA / SI *
415A	Baixo grau	Displasia moderada
444N	Baixo grau	Displasia leve
449A	Alto grau (suspeito de invasão)	Carcinoma invasor
460N	Indefinido	DA / SI *

* DA / SI: displasia acentuada / suspeito de invasão.

As diferenças mais importantes observadas na reclassificação foram as seguintes:

83N e 87N: eram normais no diagnóstico 1, e foram classificados como indefinidos para displasia no diagnóstico 2.

69N e 196A: na primeira classificação, foram incluídos como displasia leve, sendo reclassificados como reativos na segunda.

155N e 279N: haviam sido diagnosticados como displasia moderada em primeira instância, e foram agrupados como reativos na segunda.

460N: na ocasião do primeiro diagnóstico, fora enquadrado na categoria de displasia acentuada com suspeição de invasão, sendo reclassificado como indefinido para displasia.

Anexo 3

Descrição genérica das 93 características de textura nuclear utilizadas. Foram utilizadas as numerações originais do sistema TICAS, que contava com mais de quinhentas características. Por esse motivo, a numeração das características não é seqüencial. Algumas descrições, disponíveis apenas nas linguagens Fortran e C foram adaptadas para a linguagem Basic, com o objetivo de simplificar a compreensão.

Característica 1: extinção total ou densidade óptica total (DOT): é o somatório dos valores de pixels em linhas e colunas dentro da área nuclear. O denominador é um fator de correção para o sistema TICAS.

$$\text{DOT} = (1 / 16.48378975) * \sum_{(i,j)} \sum_{j=0}^{mx} \sum_{i=0}^{my} I[i][j]$$

N = área nuclear

(i, j) in N: todos os pixels dispostos em linhas e colunas dentro da área nuclear.

Característica 2: área do núcleo em micrômetros quadrados. O primeiro número no denominador é um fator de correção para o sistema óptico.

$$\text{Área} = \text{área (pixels)} / 65.935159 \text{ (pixels}/\mu^2)$$

Característica 3: Circularidade nuclear (roundness) - medida da semelhança do núcleo com relação à forma de um círculo.

$$\text{Roundness} = p^2 / (4 * \pi * A)$$

Estruturas perfeitamente circulares terão a circularidade igual a 1.

Característica 6: RMS - Root mean squared (76):

$$\text{Ext 2} = \sum_{(i,j)} \sum_{j=0}^{mx} \sum_{i=0}^{my} I[i][j]^2$$

$$\text{Ext Sum} = \sum_{j=0}^{mx} \sum_{i=0}^{my} I[i][j]$$

$$\begin{matrix} I=0 & j=0 \\ (i, j) & \text{in } N \end{matrix}$$

A = Área

$$\text{RMS} = \sqrt{\text{Ext2} - \frac{\text{ExtSum} * \text{ExtSum}}{\text{ExtSum} \cdot A}}$$

Características 8 a 25: Histograma de densidade óptica até densidade 1.8 em valores percentuais

$$10 \cdot (-i / 100) = \begin{matrix} 1.0 & \text{for } i = 0 \text{ preto} \\ 0.016 & \text{for } i = 180 - \text{ cor de fundo} \end{matrix}$$

Para a posição de cada pixel (i, j) no núcleo, calcular: OD = int (I [i] [j] / 10.0 + 0.5)

$$\text{Hist [OD]} = \text{hist [OD]} + 1$$

Existem duas possibilidades de cálculo para o histograma de densidade óptica: utilizando a coloração de Feulgen ou hematoxilina-eosina.

Considerando a faixa dinâmica da densidade óptica como 256 tons de cinza, o valor zero passa a ser branco e 255, preto.

Feulgen: a faixa dinâmica fica limitada a 180 em 18 grupos de 10 elementos. Total: 180 tons de cinza (bins: 0-10, 11-20, 21-30). Essa limitação de faixa deve-se a características da coloração.

HE: a faixa atinge os 255 tons de cinza em 17 grupos de 15 elementos (faixas: 0-15, 16-30, 31-45).

Características 26 a 61: matriz de co-ocorrência (1, 0; i, j) (Cooccurrence matrix) em 6 X 6 faixas de densidade óptica (D.O). Avalia o número de pixels adjacentes de mesma densidade em linha horizontal, gerando uma matriz como a figura A.1:

É realizada uma varredura horizontal da imagem, da esquerda para a direita, gerando um valor para cada pixel em função da densidade ótica do pixel adjacente.

Figura A1. A primeira tabela apresenta os valores de densidade óptica total (DOT) de cada elemento de imagem em uma linha horizontal com oito elementos. A segunda tabela exibe o número de ocorrências (co-ocorrências) de elementos de imagem adjacentes com valores de DOT dentro da mesma faixa.

0.3	0.3	0.9	0.4	0.4	0.4	0.6	0.3
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

D.O	00-0.3	0.31-0.6	0.61-0.9	0.91-1.2	1.21-1.5	>>1.5
0-0.3	1	1				
0.31-0.6		3	1			
0.61-0.9	1					
0.91-1.2						
1.21-1.5						
>1.5						

Características 267 a 302 Matriz de comprimento de seqüência (Run Length Matrix)

[(2, 4, 6, 8, 10, 12) X O.D. 0-1]

Avalia o número total de pixels adjacentes com mesmo valor de O.D. A varredura segue a mesma ordem descrita para 26-61 e gera também um valor para cada pixel da imagem.

Figura A.2. A primeira tabela apresenta os valores de densidade óptica total (DOT) de cada elemento de imagem em uma linha horizontal com oito elementos. A segunda tabela exhibe o número de elementos de imagem contíguos com valores de DOT dentro da mesma faixa.

0.3	0.3	0.9	0.9	0.9	0.9	0.6	0.3
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

D.O.	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
0-0.3	1					
0.31-0.6						
0.61-0.9						
0.91-1.2	3					
1.21-1.5						
>1.5						

Característica 267: Faixa de densidade óptica (DO) dividida em seis intervalos, cada um com amplitude de 0,3 unidades de DO. O número de pixels consecutivos na mesma faixa é contado. A característica 267 corresponde ao comprimento de 1 a 2 pixels na faixa de DO de 0 a 0,3.

Característica 268: o mesmo que a característica 267, mas para comprimentos de 3 a 4 pixels.

Característica 269: o mesmo que a característica 267, mas para comprimentos de 5 a 6 pixels.

Característica 270: o mesmo que a característica 267, mas para comprimentos de 7 a 8 pixels.

Característica 271: o mesmo que a característica 267, mas para comprimentos de 9 a 10 pixels.

Característica 272: o mesmo que a característica 267, mas para comprimentos de 11 a 12 pixels.

Todas as características entre 267 e 272 descrevem a mesma faixa de DO (0 a 0,3).

Característica 285: o mesmo que a característica 267, mas para comprimentos de 1 a 2 pixels e faixa de DO entre 0,9 e 1,2.

Características 303 a 307 Avaliação de seqüências

Característica 303: ênfase em seqüências curtas (Short Run Emphasis)

Característica 304 ênfase em seqüências longas (Long Run Emphasis)

Característica 305: desuniformidade de níveis de cinza (Grey Level Nonuniformity)

Característica 306 desuniformidade de comprimento de seqüência (Run Length Nonuniformity)

Característica 307: percentuais de seqüências (Run Percentage)

Considerando $rlh [i] [j]$ como um valor (i, j) na matriz de comprimento de seqüência onde:

i = unidades de D.O. e

j = comprimentos a partir dos grupos {2, 4, 6, 8, 10, 12}

$$TMP 1 = \sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^6 rlh [i] [j]$$

$$TMP 2 = \sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^6 rlh [i] [j] / j^2$$

$$TMP 3 = \sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^6 rlh [i] [j] / j^2 * rlh [i] [j]$$

$$TMP 4 = \sum_{i=1}^6 [\sum_{j=1}^6 rlh [i] [j]]^2$$

$$TMP 5 = \sum_{j=1}^6 [\sum_{i=1}^6 rlh [i] [j]]^2$$

$A = 2 * (\text{número total de seqüências possíveis de comprimento } 1)$

Logo, as características 303 a 307 podem ser definidas como:

Característica 303: Ênfase em seqüências curtas (Short Run Emphasis)

$SRE = TMP2 / TMP1$

Característica 304: Ênfase em seqüências longas (Long Run Emphasis)

$LRE = TMP3 / TMP1$

Característica 305: Desuniformidade de níveis de cinza (Grey Level Nonuniformity)

$GLN = TMP4 / TMP1$

Característica 306: Desuniformidade de comprimento de seqüência (Run Length Nonuniformity)

$$RLN = TMP5 / TMP1$$

Característica 307: Percentuais de seqüências (Run Percentage)

$$RP = TMP1 / A$$

Comentário: todos os valores são normalizados pelo número de seqüências nos limites nucleares. As ênfases em seqüências curtas e longas são autoexplicatórias: o valores de SRE e RLE refletem a distribuição dessas seqüências no núcleo celular. A desuniformidade de níveis de cinza funciona da seguinte maneira: Quando as seqüências estão distribuídas uniformemente entre as faixas de D.O., o valor de GLN tende a ser pequeno. A desuniformidade de comprimento de seqüência (RLN) mede se as seqüências estão uniformemente distribuídas através dos comprimentos ou não. Se as seqüências forem muito grandes, porém, o valor de RLN também será elevado. O percentual de seqüências (RP) é a razão entre o número total de seqüências encontradas e o número total de seqüências possíveis, o qual está relacionado à área total do núcleo. Valores baixos desse parâmetro estão relacionados a imagens com estruturas lineares.

Características 312 a 318

Característica 312: heterogeneidade de densidade óptica (het).

Característica 313: homogeneidade de densidade óptica (hom).

Característica 314: compactação (cl).

Característica 315: condensação (cond).

Característica 316: densidade óptica 20 % abaixo do valor médio em valores de cinza (av20b).

Característica 317: valor médio de densidade óptica em valores de cinza (avext).

Característica 318: densidade óptica 20 % acima do do valor médio em valores de cinza (av20a).

Características envolvendo densidade óptica:

Heterogeneidade:

$$h1 = \frac{Nb + Nw}{Nt}$$

Onde:

Nb = número de pixels pretos = pixels correspondentes a cromatina frouxa (clara)*

Nw = número de pixels brancos = pixels onde a cromatina é densa (escura)*

Nt = total de pixels no núcleo.

Característica 312: heterogeneidade: HET = h1

$$h2 = \frac{Ng}{Nt}$$

Ng = número de pixels em diferentes tons de cinza, correspondendo ao valor médio.

Nt = como definido acima.

Característica 313: homogeneidade: $h2 = 1 - h1$

Para cada conjunto de 8 pixels em uma linha deve ser computada a diferença:

$$\text{diff} = | nb - nw |$$

nb = número de pixels pretos no conjunto de 8 pixels.

nw = número de pixels brancos no mesmo conjunto.

| | = valor absoluto

a seguir, o valor cl deve ser definido:

$$cl = \sum_{i=1}^{tm} \text{diff}$$

onde:

tm = número total de conjuntos encontrados no núcleo.

Logo:

Característica 314: clumpness

$$cl = cl / nb + nw$$

Essa característica reflete a granularidade considerando o tamanho e distribuição de grânulos bem como das áreas claras.

Os oito pixels do conjunto representam menos de 1 micrômetro an direção horizontal.

Como o algoritmo é unidimensional, o cálculo de diff na coluna seguinte aplica-se ao mesmo grânulo.

* Todos os cálculos são realizados na imagem negativa.

Característica 315: condensação (condensation):

$$cond = cl / nt$$

O valor médio é definido como:

$$\mu = \frac{\sum_{(i, j)} \sum_{in N} I[i][j]}{Nt}$$

Logo:

Característica 316: densidade óptica 20 % abaixo do valor médio em valores de cinza (av20b):

$$av20b = 0,8 * \mu$$

Característica 317: valor médio de densidade óptica em valores de cinza (avext):

$$avext = \mu$$

Característica 318: densidade óptica 20 % acima do do valor médio em valores de cinza (av20a):

$$av20a = 1.2 * \mu$$

Obs.: para heterogeneidade, os valores baixos representam pouca compactação da cromatina. Valores próximos de 1 traduzem núcleos com grande compactação.

Porém o valor é aplicável para núcleos totalmente brancos bem como totalmente pretos.

Sendo a homogeneidade o complemento da heterogeneidade, ela descreve conjuntos específicos de pixels, o que significa que é possível estimar a média de valores de cinza assumindo um coeficiente de variação de 5 %.

Ambas são medidas temporais de textura, sem sensibilidade para identificar a distribuição espacial de cromatina condensada. Mapas de pixels permitem a descrição da distribuição espacial de cromatina. Valores individuais não podem descrever tais características adequadamente.

A compactação (clumpness) reflete a distribuição de grânulos em intervalos de 1 micrômetro. Grânulos pequenos determinam valores pequenos de compactação. A condensação reflete a fração correspondente aos grânulos largos. Os valores para condensação se aproximam dos valores de compactação quando todos os pixels são pretos ou brancos. Se pixels de valores intermediários estiverem presentes, o valor de condensação será menor que o da compactação.

$$\text{Cond} = \text{cl} * \text{het}$$

Características 319 a 321

Característica 319: total de pixels pretos no núcleo (nb).

Característica 320: total de pixels cinzentos no núcleo (ng).

Característica 321: total de pixels brancos no núcleo (nw).

O cálculo dessas características é feito pelo seguinte algoritmo:

Let th1 = av20b

th2 = av20a

Begin

Let nb = ng = nw = 0

For all x = (i, j) in N

```

{
if (I [ i ] [ j ] < th1) nb = nb + 1
if (I [ i ] [ j ] > = th1 AND I [ i ] [ j ] < = th2) ng = ng + 1
}

```

End

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roth MJ, Guo-Qing W, Lewin KJ, Ning L, Dawsey SM, Wesley MN, et al. Histopathologic changes seen in esophagectomy specimens from the high-risk region of Linxian, China: potential clues to an etiologic exposure? *Hum Pathol* 1998;29(11):1294-8.
2. Parkin DM, Pisani, P., Ferlay, J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993;54(4):594-606.
3. Moyana TN, Janoski M. Recent trends in the epidemiology of esophageal cancer. Comparison of epidermoid- and adenocarcinomas. *Ann Clin Lab Sci* 1996;26(6):480-6.
4. Zhou B, Jutting U, Rodenacker K, Gais P, Lin PZ. Discrimination of esophageal dysplasia with progression and nonprogression. High-resolution image analysis for surrogate end point biomarkers. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20(6):500-8.
5. Diehl AS. Alterações citológicas do esôfago em uma população de médio a alto risco detectadas por balão inflável. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Medicina: gastroenterologia. Porto Alegre: UFRGS; 1999.
6. Day NE. The geographic pathology of cancer of the oesophagus. *Br Med Bull* 1984;40(4):329-34.
7. Yoshinaka H, Shimazu H, Fukumoto T, Baba M. Superficial esophageal carcinoma: a clinicopathological review of 59 cases. *Am J Gastroenterol* 1991;86(10):1413-8.
8. Yang CS. Research on esophageal cancer in China: a review. *Cancer Res* 1980;40(8 Pt 1):2633-44.
9. Lewin KJ, Appelman, H.D. Tumors of the esophagus and stomach. Third series edition ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1996.
10. Liu FS, Wang, Q.L. Squamous cell carcinoma of the esophagus. In: Ming SC, Goldman, H., editor. *Pathology of the gastrointestinal tract*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p. 439-454.
11. Brown LM, Hoover RN, Greenberg RS, Schoenberg JB, Schwartz AG, Swanson GM, et al. Are racial differences in squamous cell esophageal cancer explained by alcohol and tobacco use? *J Natl Cancer Inst* 1994;86(17):1340-5.
12. Rao M, Liu FS, Dawsey SM, Yang K, Lipkin M, Li JY, et al. Effects of vitamin/mineral supplementation on the proliferation of esophageal squamous epithelium in Linxian, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3(3):277-9.
13. Azin F, Raie RM, Mahmoudi MM. Correlation between the levels of certain carcinogenic and anticarcinogenic trace elements and esophageal cancer in northern Iran. *Ecotoxicol Environ Saf* 1998;39(3):179-84.
14. Roth MJ, Strickland KL, Wang GQ, Rothman N, Greenberg A, Dawsey SM. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons present within food

from Linxian, China may contribute to that region's high incidence of oesophageal cancer [letter]. *Eur J Cancer* 1998;34(5):757-8.

15. Oettle GJ, Paterson AC, Leiman G, Segal I. Esophagitis in a population at risk for esophageal carcinoma. *Cancer* 1986;57(11):2222-9.

16. Poljak M, Cerar A, Seme K. Human papillomavirus infection in esophageal carcinomas: a study of 121 lesions using multiple broad-spectrum polymerase chain reactions and literature review [see comments]. *Hum Pathol* 1998;29(3):266-71.

17. Crespi M, Munoz N, Grassi A, Qiong S, Jing WK, Jien LJ. Precursor lesions of oesophageal cancer in a low-risk population in China: comparison with high-risk populations. *Int J Cancer* 1984;34(5):599-602.

18. Crespi M, Munoz N, Grassi A, Aramesh B, Amiri G, Mojtabai A, et al. Oesophageal lesions in northern Iran: a premalignant condition? *Lancet* 1979;2(8136):217-21.

19. Munoz N, Crespi M, Grassi A, Qing WG, Qiong S, Cai LZ. Precursor lesions of oesophageal cancer in high-risk populations in Iran and China. *Lancet* 1982;1(8277):876-9.

20. Dawsey SM, Lewin KJ. Histologic precursors of squamous esophageal cancer. *Pathol Annu* 1995;30((Pt 1)):209-26.

21. Dawsey SM, Lewin KJ, Wang GQ, Liu FS, Nieberg RK, Yu Y, et al. Squamous esophageal histology and subsequent risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. A prospective follow-up study from Linxian, China. *Cancer* 1994;74(6):1686-92.

22. Qiu SL, Yang GR. Precursor lesions of esophageal cancer in high-risk populations in Henan Province, China. *Cancer* 1988;62(3):551-7.

23. Shine I, Allison PR. Carcinoma of the oesophagus with tylosis (keratosis palmaris et plantaris). *Lancet* 1966;1(7444):951-3.

24. Schwindt WD, Bernhardt LC, Johnson AM. Tylosis and intrathoracic neoplasms. *Chest* 1970;57(6):590-1.

25. Syrjanen KJ. Histological changes identical to those of condylomatous lesions found in esophageal squamous cell carcinomas. *Arch Geschwulstforsch* 1982;52(4):283-92.

26. Sur M, Cooper K. The role of the human papilloma virus in esophageal cancer. *Pathology* 1998;30(4):348-54.

27. Koss LG. Human papillomavirus--passenger, driver, or both? [editorial; comment]. *Hum Pathol* 1998;29(4):309-10.

28. Chen B, Yin H, Dhurandhar N. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal squamous cell carcinomas by the polymerase chain reaction using general consensus primers [see comments]. *Hum Pathol* 1994;25(9):920-3.

29. Carter R, Brewer LA, III. Achalasia and esophageal carcinoma. Studies in early diagnosis for improved surgical management. *Am J Surg* 1975;130(2):114-20.

30. Wychulis AR, Woolam GL, Andersen HA, Ellis FH, Jr. Achalasia and carcinoma of the esophagus. *Jama* 1971;215(10):1638-41.

31. Aggestrup S, Holm JC, Sorensen HR. Does achalasia predispose to cancer of the esophagus? *Chest* 1992;102(4):1013-6.

32. Sandler RS, Nyren O, Ekblom A, Eisen GM, Yuen J, Josefsson S. The risk of esophageal cancer in patients with achalasia. A population-based study. *Jama* 1995;274(17):1359-62.
33. Streitz JM, Jr., Ellis FH, Jr., Gibb SP, Heatley GM. Achalasia and squamous cell carcinoma of the esophagus: analysis of 241 patients. *Ann Thorac Surg* 1995;59(6):1604-9.
34. Brucher BL, Stein HJ, Feussner H, Bartels H, Siewert JR. [Achalasia and carcinoma of the esophagus: incidence, prevalence and prognosis]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;115:1357-9.
35. Loviscek LF, Cenoz MC, Badaloni AE, Agarinakazato O. Early cancer in achalasia. *Dis Esophagus* 1998;11(4):239-47.
36. Yamamuro EM, Cecconello I, Iriya K, Tomishigue T, Oliveira MA, Pinotti HW. Lugol dye endoscopy for analysis of esophageal mucosa in achalasia. *Hepatogastroenterology* 1999;46(27):1687-91.
37. Li FP, Shiang EL. Screening for oesophageal cancer in 62 000 Chinese [letter]. *Lancet* 1979;2(8146):804.
38. Weinstein WM, Bogoch ER, Bowes KL. The normal human esophageal mucosa: a histological reappraisal. *Gastroenterology* 1975;68(1):40-4.
39. Ismail-Beigi F, Horton PF, Pope CE. Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology* 1970;58(2):163-74.
40. Dawsey SM, Lewin KJ, Liu FS, Wang GQ, Shen Q. Esophageal morphology from Linxian, China. Squamous histologic findings in 754 patients [see comments]. *Cancer* 1994;73(8):2027-37.
41. Papanicolaou GN. *Atlas of exfoliative cytology*. Cambridge, Mass: Harvard University Press; 1954.
42. Reagan JW, Siedermann, I.L., Saracusa, T. The cellular morphology of carcinoma in-situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. *Cancer* 1953;6:224.
43. Wied GL. An international agreement on histological terminology for lesions of the uterine cervix. *Acta cytologica* 1962;6:236.
44. Bartels PH. *Classification*. Chicago: Tutorials of cytology; 1994.
45. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 1973;8:301-28.
46. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *Jama* 1989;262(7):931-4.
47. Nakamura K, Sugano H, Takagi K, Fuchigami A. Histopathological study on early carcinoma of the stomach: criteria for diagnosis of atypical epithelium. *Gann* 1966;57(6):613-20.
48. Morson BC, Sobin LH, Grundmann E, Johansen A, Nagayo T, Serck-Hanssen A. Precancerous conditions and epithelial dysplasia in the stomach. *J Clin Pathol* 1980;33(8):711-21.
49. Ming SC, Bajtai A, Correa P, Elster K, Jarvi OH, Munoz N, et al. Gastric dysplasia. Significance and pathologic criteria. *Cancer* 1984;54(9):1794-801.
50. Goldstein NS, Lewin KJ. Gastric epithelial dysplasia and adenoma: historical review and histological criteria for grading. *Hum Pathol* 1997;28(2):127-33.
51. Schlemper RJ, Borchard F, Dixon MF, Koike M, Mueller J, Stolte M, et al. International comparability of the pathological diagnosis for early cancer of the digestive tract: Munich meeting. *J Gastroenterol* 2000;35(Suppl 12):102-10.

52. Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, et al. Differences in diagnostic criteria for gastric carcinoma between Japanese and western pathologists [see comments] [published erratum appears in *Lancet* 1997 Aug 16;350(9076):524]. *Lancet* 1997;349(9067):1725-9.
53. Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, et al. Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;82(1):60-9.
54. Schlemper RJ, Dawsey SM, Itabashi M, Iwashita A, Kato Y, Koike M, et al. Differences in diagnostic criteria for esophageal squamous cell carcinoma between Japanese and Western pathologists [see comments]. *Cancer* 2000;88(5):996-1006.
55. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2000;47(2):251-5.
56. Rubio CA, Liu FS, Zhao HZ. Histological classification of intraepithelial neoplasias and microinvasive squamous carcinoma of the esophagus. *Am J Surg Pathol* 1989;13(8):685-90.
57. Rosai J. Pathology: a historical opportunity [editorial]. *Am J Pathol* 1997;151(1):3-6.
58. O'Leary TJ, Steffes MW. Can you count on the mitotic index? *Hum Pathol* 1996;27(2):147-51.
59. Stenkvist B, Westman-Naeser S, Vegelius J, Holmquist J, Nordin B, Bengtsson E, et al. Analysis of reproducibility of subjective grading systems for breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1979;32(10):979-85.
60. Javey H, Borazjani G, Behmard S, Langley FA. Discrepancies in the histological diagnosis of hydatidiform mole. *Br J Obstet Gynaecol* 1979;86(6):480-3.
61. True LD. Morphometric applications in anatomic pathology. *Hum Pathol* 1996;27(5):450-67.
62. Marchevsky AM, Erler, B.S., Morphometry in pathology. In: Marchevsky AM, Bartels, P.H., editor. *Image analysis - a primer for pathologists*. New York: Raven Press; 1994. p. 125-180.
63. Mariuzzi GM, Montironi R. Quantitative microscopy and index formulation in continuous pathologic lesions. *Appl Pathol* 1986;4(1-2):43-7.
64. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 1988;96(5):379-94.
65. Cohen C. Image cytometric analysis in pathology. *Hum Pathol* 1996;27(5):482-93.
66. Partin AW, Steinberg GD, Pitcock RV, Wu L, Piantadosi S, Coffey DS, et al. Use of nuclear morphometry, Gleason histologic scoring, clinical stage, and age to predict disease-free survival among patients with prostate cancer. *Cancer* 1992;70(1):161-8.
67. Lindholm J, Rubio CA, Kato Y, Hata J. A morphometric method to discriminate normal from dysplastic/carcinoma in situ squamous epithelium in the human esophagus. *Pathol Res Pract* 1989;184(3):297-305.

68. Bibbo M, Bartels PH, Bahr GF, Ng AB, Reagan JW, Richards DL, et al. Data bank for endometrial cells. Operation of the TICAS file project. *Acta Cytol* 1970;14(9):574-82.
69. Bartels PH, Bahr GF, Calhoun DW, Wied GL. Cell recognition by neighborhood grouping techniques in TICAS. *Acta Cytol* 1970;14(5):313-24.
70. Bartels PH, da Silva VD, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L, et al. Chromatin texture signatures in nuclei from prostate lesions. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20(5):407-16.
71. Bartels PH, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L, Bartels HG. Nuclear chromatin texture in prostatic lesions. II. PIN and malignancy associated changes. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20(5):397-406.
72. Bartels PH, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L, Bartels HG. Nuclear chromatin texture in prostatic lesions. I. PIN and adenocarcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20(5):389-96.
73. da Silva VD, Montironi R, Thompson D, Bartels HG, Vaught L, Hamilton PW, et al. Chromatin texture in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and early invasive carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21(2):113-20.
74. Bartels P, Thompson, D. The video photometer. In: Marchevsky A, Bartels, PH, editor. *Image analysis: a primer for pathologists*. New York: Raven Press; 1994. p. 29-56.
75. Inoué S SK. Detection of light and monochrome Vidicon Cameras. In: Inoué S SK, editor. *Video Microscopy*. New York: Plenum Press; 1997. p. 233-271.
76. Sokal R RR. Assumptions of analysis of variance. In: Sokal R RF, editor. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. New York: W.H. Freeman; 1995. p. 392-440.
77. M. T. Discriminant analysis: the study of group differences. In: Champaign I, editor. *Institute for Personality and Ability Testing*. USA; 1971.
78. da Silva VD, Prolla JC, Sharma P, Sampliner R, Thompson D, Bartels PH. Karyometry in Barrett's esophagus. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; Aceito para publicação.
79. Stevens A, Bancroft JD. Proteins and nucleic acids. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 1990. p. 143-154.
80. Suit PF, Bauer TW. DNA quantitation by image cytometry of touch preparations from fresh and frozen tissue. *Am J Clin Pathol* 1990;94(1):49-53.
81. Bozzo P, Alberts DS, Vaught L, da Silva VD, Thompson D, Warnecke J, et al. Measurement of chemopreventive effect in skin biopsies. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; Aceito para publicação. :em publicação.
82. Weyn B, Jacob W, da Silva VD, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, et al. Data representation and reduction for chromatin texture in nuclei from premalignant prostatic, esophageal, and colonic lesions [In Process Citation]. *Cytometry* 2000;41(2):133-8.
83. Linder J, Johnston, W.W. Cytopathology. In: Ivan Damjanov JL, editor. *Anderson's Pathology*. ST Louis, Mi: Mosby; 1996. p. 47-79.
84. Holth LT, Chadee DN, Spencer VA, Samuel SK, Safneck JR, Davie JR. Chromatin, nuclear matrix and the cytoskeleton: role of cell structure in neoplastic transformation (Review) [In Process Citation]. *Int J Oncol* 1998;13(4):827-37.

85. Penman S. Rethinking cell structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(12):5251-7.
86. Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(3):849-54.
87. Barboro P, Alberti I, Sanna P, Parodi S, Balbi C, Allera C, et al. Changes in the cytoskeletal and nuclear matrix proteins in rat hepatocyte neoplastic nodules in their relation to the process of transformation. *Exp Cell Res* 1996;225(2):315-27.
88. Maniotis AJ, Bojanowski K, Ingber DE. Mechanical continuity and reversible chromosome disassembly within intact genomes removed from living cells. *J Cell Biochem* 1997;65(1):114-30.
89. Myers CA, Schmidhauser C, Mellentin-Michelotti J, Fragoso G, Roskelley CD, Casperson G, et al. Characterization of BCE-1, a transcriptional enhancer regulated by prolactin and extracellular matrix and modulated by the state of histone acetylation. *Mol Cell Biol* 1998;18(4):2184-95.
90. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers [In Process Citation]. *Nature* 1998;396(6712):643-9.
91. Brodeur GM, Hogarty MD. The genetic basis of cancer. In: Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The genetic basis of cancer*. New York: McGraw-Hill; 1998. p. 161-179.
92. Heppner GH, Miller FR. The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol* 1998;177:1-56.
93. Strauss BS. The origin of point mutations in human tumor cells. *Cancer Res* 1992;52(2):249-53.
94. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194(4260):23-8.
95. Shapiro JR, Yung WK, Shapiro WR. Isolation, karyotype, and clonal growth of heterogeneous subpopulations of human malignant gliomas. *Cancer Res* 1981;41(6):2349-59.
96. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. *Catalogue of chromosomal aberrations in cancer*. New York: Wiley-Liss; 1994.
97. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia [see comments]. *Nat Genet* 1997;15 Spec No:417-74.
98. Kelloff GJ, Boone CW, Crowell JA, Nayfield SG, Hawk E, Malone WF, et al. Risk biomarkers and current strategies for cancer chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* 1996;25:1-14.