

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

CARIOMETRIA DIGITAL
EM ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS

VIVIAN PIERRI BERSCH

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre
2001

FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

4.00.00.00-1 CIÊNCIAS EM SAÚDE

4.01.00.00-6 MEDICINA

4.01.02.00-9 CIRURGIA

4.01.02.06-8 CIRURGIA GASTROENTEROLÓGICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CARCINOGENESE GASTROINTESTINAL

LINHA DE PESQUISA: CARCINOGENESE BILIOPANCREÁTICA

**CARIOMETRIA DIGITAL
EM ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS**

VIVIAN PIERRI BERSCH

ORIENTADORES: PROF. DR LUIZ ROHDE
DR VINICIUS DUVAL DA SILVA

Porto Alegre
2001

Aos meus pais, Rosvita e Paulo e aos meus irmãos, Paula e Roberto.

Obrigada pelo incentivo, pelo apoio e por acreditarem em mim.

Obrigada pela honestidade de seus sentimentos e ações.

Vocês são minha fortaleza, meu lugar seguro, meu aconchego.

São meus exemplos de coragem e perseverança,

de vontade e capacidade.

Ensinaram-me a reconhecer o certo e o errado,

o verdadeiro e o falso,

o que vale a pena e o que não vale.

Na importância dada às tentativas, às dúvidas e aos fracassos,
ensinaram-me o porquê de aplicar qualidade em tudo aquilo que se faz!

Obrigada mãe, obrigada pai, obrigada Paula, obrigada Roberto.

À minha muito amada vó Rosita (*in memoriam*)

e aos meus padrinhos, Doris e Erwin.

A vocês dedico este meu primeiro trabalho.

Vó Ita,

Tuas Memórias não puderam ser concluídas,

mas a recordação de todas as tuas estórias, bem como vários dos teus gestos

não abandonaram a nossa memória e

certamente se propagarão por muitas e muitas gerações.

Dinda e Dindo,

Aos sete anos de idade acolhi a decisão dos meus pais.

Hoje reconheço que os laços que me unem a vocês tornam-se cada vez mais intensos com o passar dos dias, apesar da distância.

Vocês são os padrinhos que eu me orgulho de ter.

Ao Dr Alessandro Bersch Osvaldt.

Primo, que na verdade não é, amigo e colega que sempre será.

Aprendi e aprendo contigo a cada dia que passa...

Teu constante anseio de aprendizado, qualificação e
aprimoramento são contagiantes...

Teu comprometimento, respeito e lealdade, inquestionáveis...

Teu caráter, admirável!

És um grande médico e provavelmente serás um grande mestre!

Obrigada pelo apoio e auxílio.

Ao Professor Dr Luiz Rohde.

O que dizer de um professor que honra seus compromissos sempre com seriedade,
competência, disposição e afeto?

O que dizer de um professor que muito sabe e nada jamais oculta?

Incansável em sua eterna atualização?

Talvez nada que ele já não saiba...

Apenas agradecer a oportunidade de trabalhar a seu lado, sedimentando, a cada momento,
conceitos e experiências tão marcantes e sempre tão sensatas.

Seus ensinamentos me tornaram, não só uma médica, mas uma pessoa mais digna.

Meu maior mérito foi ter sido sua aluna, residente e "orientanda".

Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer a algumas pessoas e instituições que foram essenciais para a conclusão deste projeto.

Ao Dr Vinicius Duval da Silva por compartilhar seus conhecimentos e principalmente por orientar e acompanhar toda análise deste estudo.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Grupo de Pesquisa e Pós-graduação, Serviço de Arquivo Médico e Serviço de Patologia pela confiança depositada e presteza de seus serviços.

À Biblioteca da Faculdade de Medicina da UFRGS e seus funcionários pelo constante auxílio junto aos arquivos de revistas médicas e pela indexação desta obra.

Ao CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

À Dra Simone Hauck pelo auxílio junto à coleta de dados.

Ao Dr Mário Sérgio Borges da Costa pela atenciosa e dedicada revisão da versão em língua inglesa, e aos demais integrantes do Grupo de Pesquisa em Pâncreas e Vias Biliares do HCPA, Dr Luis Roberto Wendt, acadêmicos Jorge Meinhardt, Diego Mossmann, Daniel Zylbersztein, Ariane Nádia Backes, Gustavo Fornari Vanni, Luis Carlos Adamatti, pelo estímulo e coleguismo.

Ao Professor Dr Mário Bernardes Wagner pelo valioso auxílio na elaboração estatística.

À Sra Estela Maris Araripe, secretária do Programa de Pós-graduação em Medicina:
Cirurgia. Sempre preocupada com o desempenho dos alunos deste curso e principalmente
com o bom andamento das disciplinas que o mesmo oferece.

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	XIII
Lista de figuras.....	XIV
Lista de gráficos.....	XV
Resumo.....	XVI
Abstract.....	XVII
INTRODUÇÃO.....	18
Aspectos gerais do adenocarcinoma de pâncreas.....	19
Justificativa para o estudo.....	23
Conceitos de morfometria, fotometria, análise digital e assinatura digital.....	24
O sistema <i>TICAS</i>	26
OBJETIVO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	30
População estudada	32

Preparação do material.....	33
Características da textura do DNA.....	34
Aquisição e processamento das imagens.....	34
Delineamento do estudo.....	38
Análise estatística.....	38
Aspectos bioéticos.....	39
RESULTADOS.....	40
População estudada.....	41
Características nucleares.....	41
Médias e desvios padrões.....	43
Pontos de corte.....	47
Assinaturas digitais.....	49
DISCUSSÃO.....	54
População estudada.....	55
Preparação do material.....	59
Assinaturas digitais.....	60
CONCLUSÕES.....	64
PERSPECTIVAS.....	66
ANEXO.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gastroduodenopancreatectomias no HCPA.....	30
Tabela 2. Exemplo da tabela utilizada na investigação das características nucleares em cada arquivo de núcleos segmentados. Tabela parcial.....	35
Tabela 3. Distância média padronizada da população normal	37
Tabela 4. Características cariométricas e suas demais denominações.....	40
Tabela 5. Médias e desvios padrões das características cariométricas em ambos os grupos com níveis de significância.....	42
Tabela 6. Intervalos nos valores das médias das características cariométricas em ambos os grupos. Valor máximo, médio e mínimo, percentis 25 e 75.....	46
Tabela 7. Intervalos de valor máximo e mínimo nas médias das sete características cariométricas que apresentaram perfeita discriminação entre os dois grupos e seus indicadores de neoplasia.....	47
Tabela 8. Valores utilizados na confecção dos histogramas para ambos os grupos.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Campo microscópico. Tecido pancreático normal.....	34
Figura 2. Campo microscópico. Tecido pancreático neoplásico.....	34
Figura 3. Arquivo de núcleos segmentados. Tecido neoplásico.....	34
Figura 4. Histograma. Tecido normal.....	50
Figura 5. Histograma. Tecido neoplásico.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Desvios padrões das características cariométricas. Tecido normal..... 43

Gráfico 2. Desvios padrões das características cariométricas. Tecido neoplásico... 44

RESUMO

O adenocarcinoma de pâncreas continua sendo uma doença com alta mortalidade apesar dos avanços na ciência e na tecnologia. O diagnóstico é tardio, na maior parte dos casos, impossibilitando uma abordagem com fins curativos. Os estudos em busca de um método para o diagnóstico precoce ou mesmo um tratamento eficaz, até o momento, não revelaram mudanças significativas. Atualmente, pesquisas em biologia molecular apontando alterações em determinados genes nos tumores de pâncreas parecem ser promissoras. Neste sentido, porém seguindo uma outra linha de pesquisa, o estudo atual que objetiva a determinação das características nucleares das células neoplásicas através da cariometria por análise digital, constitui um passo inicial para futuras especulações. Recentemente, estudos em outros tecidos como o prostático, o mamário e o endométrio vêm demonstrando existir eficácia na diferenciação entre seus tecidos normais e neoplásicos e também uma forte relação entre as alterações encontradas na cromatina de seus núcleos celulares e a agressividade de seus respectivos tumores. Utilizando-se tecido pancreático estocado em parafina por até onze anos no laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), foram determinadas as características nucleares em mil e trezentos núcleos de células ductais de adenocarcinoma de pâncreas e de tecido pancreático normal. Noventa e três características da cromatina foram estudadas por análise digital. Onze características apresentaram valores diferentes entre os dois grupos e estas diferenças foram estatisticamente significativas. A média para o valor da ÁREA nuclear nos tumores foi de 977.78 e de 336.60, no tecido normal; a da RLM278 foi de 353.23 e 97.07; a da RLM266 de 99.32 e 28.06; a do PERIM de 125.58 e 65.05; a do ROUND de 1.37 e 1.04; a da IOD de 123.49 e 107.97; a da FRACDIM de 1.22 e 1.05; a da DENSMIN de 0.01 e 0.14; a da DENSMAX de 0.53 e 0.62; a da DENSSD 0.25 e 0.10 e a da DENS20P de 0.49 e 0.33, respectivamente para os núcleos dos tumores e para os do tecido normal. Sete destas características serviram como marcadores ideais de neoplasia. Estes achados permitiram a criação de uma assinatura digital específica para cada um dos dois tipos de tecido estudado.

ABSTRACT

Pancreatic adenocarcinoma still results in high mortality rates despite recent advances in science and technology. The diagnosis is late in most cases, hindering the possibilities of cure. So far, studies searching for early diagnostic methods or effective treatment of pancreatic cancer have not resulted in significant changes. Molecular biology has recently expanded our knowledge about the association between gene abnormalities and pancreatic cancer. Following a different research line, this study aims to determine nuclear features of neoplastic cells through digital karyometry assessment, proposing a first step for future speculations. Studies of other tissues like prostate, breast, and endometrium have recently shown efficacy in differentiating between their normal and neoplastic tissues and also a strong relation between changes found in chromatin of cell nuclei and tumor aggressiveness.

In the present study, nuclear features were determined in one thousand and three hundred cells removed from cancerous and normal pancreatic tissue stored at the HCPA Pathology Unit through an eleven year period. Ninety-three chromatin features were studied by digital karyometry. Eleven features showed significantly different values between both groups. The average values for nuclear AREA in cancerous and normal tissue was, respectively, 977.78 and 336.60; for RLM278 was 353.23 and 97.07; for RLM266 99.32 and 28.06; PERIMETER of 125.58 and 65.05; ROUNDNESS of 1.37 and 1.04; IOD of 123.49 and 107.97; FRACDIM of 1.22 and 1.05; DENSMIN of 0.01 and 0.14; DENSMAX of 0.53 and 0.62; DENSSD of 0.25 and 0.10; and DENS20P of 0.49 and 0.33, for cancerous nuclei and normal nuclei, respectively. Seven of those features served as ideal neoplasm markers. Such findings yielded the creation of a specific digital signature for each of the two types of studied tissues.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Aspectos gerais do adenocarcinoma de pâncreas

Das neoplasias de pâncreas, o adenocarcinoma ductal é a mais freqüente, representando 90% dos tumores. Nos Estados Unidos, a incidência anual do adenocarcinoma de pâncreas é de aproximadamente nove casos para 100.000 habitantes. Ocupa o décimo primeiro lugar entre as neoplasias malignas mais freqüentes, sendo a quinta causa de morte por câncer e a segunda causa de morte por neoplasia do aparelho digestivo, com sobrevida média entre 3% e 4% em cinco anos^{1,2,3,4,5,6}. Em 1998, no estado do Rio Grande do Sul, foram registrados 532 óbitos por neoplasia de pâncreas divididos de forma semelhante entre ambos os sexos⁷. Esta doença acomete até duas vezes mais os homens do que as mulheres, sendo que sua incidência aumenta em pacientes mais idosos. Os fatores de risco para a doença são fumo, dieta rica em gorduras não saturadas, exposição a alguns derivados do petróleo e doenças como diabetes e pancreatite crônica, entretanto os mecanismos fisiopatológicos ainda não foram totalmente esclarecidos. Existem evidências recentes mostrando uma associação significativa entre o alcoolismo e o surgimento do câncer de pâncreas^{1,2,3,4}.

O diagnóstico da doença ocorre tardiamente, na maior parte dos casos. De todos os pacientes diagnosticados, aproximadamente 10% apenas apresentam tumor confinado ao pâncreas⁵. A falta de especificidade dos sintomas contribui para o retardo do diagnóstico: os sintomas vagos como anorexia, saciedade e astenia antecedem a icterícia e ou a dor abdominal em pelo menos quatro meses. A icterícia e a dor abdominal são justamente os

motivos que levam o paciente à procura de atendimento médico ^{8,9,10}. A avaliação diagnóstica consiste na anamnese, no exame clínico, na análise laboratorial e nos exames de imagem ^{5,6,10}. As análises citológica ou histológica fornecem o diagnóstico de certeza ^{3,10,11,12,13}. Até o momento não há marcador tumoral para o diagnóstico do adenocarcinoma de pâncreas. Entre os mais estudados, o antígeno Carboidrato Câncer Associado (CA 19.9) tem sido apontado como o único com sensibilidade e especificidade aceitáveis para o seguimento dos pacientes, porém sua utilidade como método de rastreamento populacional ainda é controversa ^{10,14,15}. A avaliação genética dos pacientes com este adenocarcinoma tem demonstrado a existência de mutações específicas que geram ativação no gene k-ras (protooncogene), perda da função do p-53 (gene supressor tumoral) e expressão aumentada dos fatores de crescimento tumoral. Outros genes estão sendo estudados e provavelmente em um futuro próximo a caracterização gênica dos tumores será alcançada ^{16,17,18}.

O tratamento depende basicamente do estágio da doença, sendo a cirurgia o único meio de cura potencial existente ^{10,19,20}. O uso de quimioterapia e de radioterapia em conjunto ou isoladamente não teve impacto na mortalidade total dos pacientes tratados, em nenhum de seus estádios ^{5,21}, embora, em alguns centros de referência, existam protocolos que empregam esquemas de drogas associadas ou não a radioterapia em nível experimental ^{22,23}.

Após avaliação inicial, pode-se definir o tipo de tratamento: paliativo ou com intenção curativa. A escolha entre esses depende basicamente de um conjunto de variáveis, como o tamanho do tumor, o comprometimento de linfonodos, a invasão em órgãos vizinhos e a presença de metástases, além das condições clínico-anestésicas do paciente. A

partir desses dados, são determinadas a possibilidade de ressecção do tumor e as condições de operabilidade do paciente ^{6,24,25}. Aos pacientes com tumores considerados irresssecáveis e com obstrução biliar ou gastroduodenal é oferecido tratamento paliativo cirúrgico para descompressão de um ou de ambos os sistemas, conforme a necessidade. Caso estes pacientes não tenham condições clínico-anestésicas ou sua sobrevida estimada seja menor do que quatro meses, a desobstrução endoscópica ou percutânea da via biliar através da colocação de próteses é a melhor opção ^{26,27,28}. Os pacientes sem co-morbidades e com tumores passíveis de ressecção são levados à gastroduodenopancreatectomia ^{6,10,29}.

Em relação aos fatores prognósticos, vários estudos têm comprovado a associação entre tamanho do tumor pancreático primário, extensão livre das margens cirúrgicas, metástases para linfonodos e ploidia nuclear com a taxa de sobrevida ^{30,31}. Todos estes fatores se originam da combinação da análise macro e microscópica do material ressecado e por este motivo os resultados se referem quase que exclusivamente ao grupo de pacientes que chega à ressecção cirúrgica, ou seja, de uma forma global, um grupo com prognóstico semelhante e que não ultrapassa 12 % dos pacientes com a neoplasia ^{4,30,31}. Assim, a maior parte dos pacientes fica sem avaliação prognóstica adequada.

Acompanhando as tendências atuais em investigação citogenética, e partindo-se da premissa que o diagnóstico de certeza dos tumores malignos do pâncreas deriva do estudo cito ou histológico, sendo o núcleo celular o componente isolado de maior valor para tal diagnóstico³², decidiu-se estudar a cariometria na avaliação dos núcleos de células ductais glandulares do tecido pancreático normal e neoplásico. Estudos recentes em adenocarcinoma de próstata^{33,34,35}, carcinoma ductal de mama^{36,37}, endométrio^{38,39,40,41} e em

carcinoma de colo uterino⁴², entre outros órgãos^{43,44,45,46,47,48}, mostram que a cariometria, associada à análise digital das imagens, determina padrões de apresentação do DNA nuclear específicos que atuam como indicadores do grau de agressividade da célula tumoral com boa acurácia. Seus autores acreditam ainda que tais padrões poderiam ser relacionados ao prognóstico dos pacientes, uma vez que apresentam alta sensibilidade e especificidade como indicadores de alteração do funcionamento celular³⁴. Em um destes estudos, avaliando-se os achados cariométricos em amostras de espécimes da papila de Vater foi demonstrado que a alteração na forma de distribuição da cromatina nuclear, dependente do tipo de lesão (displasia, neoplasia bem diferenciada, moderadamente ou pouco diferenciada), pode ser o achado mais precoce no processo de malignização dos tumores. A alteração no conteúdo do DNA parece ser, portanto, um fenômeno mais tardio⁴⁹. Até o momento, pouco se sabe a respeito deste conceito em relação aos tumores de pâncreas. Os únicos relatos existentes estabelecem que a ploidia celular, ou seja, de uma forma simplista, a quantidade de DNA nuclear, tem demonstrado valor preditivo superior como fator prognóstico isolado quando comparada com outros parâmetros. Os pacientes com tumores pancreáticos aneuplóides estão sujeitos a uma sobrevida média menor que os com tumores diplóides^{30,31,50}. A ploidia celular, no entanto, é apenas uma das múltiplas variáveis que podem ser verificadas pela associação da morfometria com a fotometria, estando principalmente relacionada a esta última, já que indiretamente sua obtenção é análoga à da densidade óptica³². A determinação das características morfo e fotométricas do núcleo, em conjunto, originam as medidas cariométricas e, portanto, fornecem a base para quantificação em biologia.

Justificativa para o estudo

O autor e os orientadores deste estudo tiveram um especial interesse em desenvolver este projeto porque, até o momento do seu início, não havia relatos na literatura quanto ao padrão de apresentação da cromatina nos núcleos de células do tecido pancreático normal ou neoplásico, como existem para outros tecidos, já referidos anteriormente. Além disso, um dos orientadores (VDS) esteve envolvido, como pesquisador, no desenvolvimento da técnica de assinatura digital para o tecido prostático^{33,34,51,52} e atualmente é profissional de referência no Brasil para emprego desta análise. O outro orientador (LR) e a autora são integrantes do grupo de pesquisa em pâncreas e vias biliares da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde, em conjunto com outros participantes, tanto no nível da graduação, quanto no da pós-graduação (*lato sensu e stricto sensu*), desenvolvem projetos nesta área. Ambos também atuam na equipe de Cirurgia do Pâncreas e de Vias Biliares do HCPA.

Esta dissertação fundamenta-se assim em um estudo original, com investigação inédita das características morfo e fotométricas nucleares das células pancreáticas ductais normais e neoplásicas pelo método da análise digital.

Conceitos de cariometria, morfometria, fotometria e análise digital

A interpretação de material biológico preparado para estudos histológicos ou citológicos sempre foi baseada na experiência pessoal do patologista, o que demonstra a sua natureza subjetiva ³². A constante busca por um método capaz de acrescentar objetividade a estas análises, determinam o desenvolvimento de novas técnicas e classificações, que difundidas mundialmente, auxiliam no perfeito reconhecimento do processo patológico em questão ⁵³. Com este objetivo, o estudo cariométrico vem sendo apontado como um meio acurado na quantificação e conseqüente classificação diagnóstica em patologia ^{54,55}. Utilizando-se inteligência artificial são adicionadas informações complementares cuja mensuração somente é alcançada com a interpretação digital, pois geralmente estas detecções excedem a capacidade visual obtida através da microscopia óptica³⁴. Muitas destas podem ser alterações mínimas a nível celular ou tecidual e mesmo assim podem expressar achados muito valiosos, até então desconhecidos pelos métodos de avaliação subjetiva, como por exemplo, os eventos que ocorrem na progressão dos processos patológicos ^{36,41}.

CARIOMETRIA

Toda avaliação morfométrica e fotométrica (também conhecida como densimétrica) que se procede sobre um núcleo celular ³².

MORFOMETRIA NUCLEAR

Método capaz de mensurar características descritivas e quantitativas do núcleo. Estuda sua forma geométrica, superfície e área através da microscopia óptica convencional ^{54,55}.

FOTOMETRIA NUCLEAR

Estuda a densidade óptica dos elementos nucleares com a microscopia óptica convencional ^{54,55}.

DIGITALIZAÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS NUCLEARES

Consiste na transformação da imagem obtida na microscopia óptica em informação numérica que será analisada por um sistema de computador. Passa por algumas etapas que completam o processo: captura e transcrição da imagem para o formato digital, processamento da imagem, segmentação, extração das características morfo e fotométricas, análise destas características e classificação. A interpretação das imagens digitalizadas dos núcleos dá origem a diferentes valores para os distintos padrões de apresentação ou textura da cromatina. Tais padrões provêm da combinação de muitos caracteres, inclusive e principalmente dos subvisuais. Estes caracteres referem-se a informações complementares aos achados da microscopia óptica convencional que não seriam detectados sem a aplicação da análise de imagem digital. Portanto, tal interpretação permite a criação de uma assinatura digital específica para cada núcleo. Esta técnica pode ainda fornecer dados que resultem na distinção entre lesões pré-malignas, malignas, e tecido normal, apenas com a avaliação isolada do núcleo ^{32,36,41,52,56}.

ASSINATURA DIGITAL

Assinatura digital é a denominação dada para um histograma contendo um determinado conjunto de características que representam a organização da cromatina nuclear, como já foi mencionado, obtida através da análise digital das imagens da microscopia óptica convencional ³². A ordem de disposição das características no histograma deve seguir um padrão para facilitar seu reconhecimento. No entanto, a troca de posição destas características não altera o significado da assinatura digital, desde que a mesma ordem seja seguida em todos os núcleos ou tecidos a serem comparados. Sempre que houver mudança na disposição das características é mandatório o esclarecimento desta alteração para uma adequada aplicação dos resultados.

O Sistema *TICAS*

O sistema *TICAS* - Taxonomic Intra-Cellular Analytic System for Cell Identification - foi desenvolvido na Universidade de Chicago nos Estados Unidos em 1968 por Weid GL, Bartels PH e seu colaboradores. O objetivo era caracterizar o material examinado em relação à distribuição espacial de sua cromatina, utilizando-se um computador. Para tanto, foram comparados dois tipos distintos de tecidos humanos. Os resultados do projeto revelaram um grande sucesso com a correta caracterização das células⁵⁷. Desde então, já foram catalogadas no sistema mais de 500 características cariométricas, determinadas a partir da avaliação de sua frequência de ocorrência em mais de 200 mil células epiteliais de diferentes tecidos. Cada uma das características recebeu um

algarismo arábico como denominação, com uma nomenclatura própria ou expressão para seu esclarecimento. Muitas delas não possuem uma nomenclatura familiar, e são explicadas por fórmulas matemáticas, sem tradução para a nossa linguagem. Por exemplo, a característica número 3, chamada de circularidade do núcleo (*roundness*, como é definida no trabalho original), ou seja, o quanto a forma do núcleo se aproxima a de um círculo perfeito, é o resultado de uma equação matemática que divide o valor do perímetro ao quadrado pelo valor resultante da multiplicação do número 4 pelo valor de π , pelo valor da área do núcleo (anexo). Esta característica é perfeitamente compreendida por todos que possuem um conhecimento mínimo em geometria. Já o valor da característica número 8, citando-se outro exemplo, corresponde a uma porção do histograma de densidade óptica até densidade 1,8 em valores percentuais. Nota-se que sua tradução para a nossa linguagem é quase que impossível, sendo necessário, para sua compreensão, um conhecimento apurado em matemática analítica. Sua descrição também é encontrada no anexo.

Atualmente o sistema *TICAS* vem sendo empregado em pesquisas nos mais diversos tipos de tecido com intenção diagnóstica e prognóstica ^{33,34,36,41,43,44,47}. Assim como ele, existem outros programas de computador (*softwares*), alguns comerciais, que podem ser aplicados na avaliação cariométrica. Entre os mais conhecidos e utilizados, encontram-se Kontron (Kontron, Gmb) e o SigmaScan Proplus ⁵⁸. Neste trabalho a escolha do sistema *TICAS* entre os demais deveu-se à grande experiência vivenciada por um de seus orientadores (VDS) com tal programa.

OBJETIVO

OBJETIVO

Caracterizar os núcleos de células pancreáticas normais e neoplásicas através da morfometria e da fotometria analisadas por sistema digital, determinando o padrão de apresentação da sua cromatina.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado coletando-se dados dos prontuários de todos os pacientes submetidos a gastroduodenopancreatectomia cefálica entre janeiro de 1988 e janeiro de 1999 no HCPA. Neste período foram realizadas setenta gastroduodenopancreatectomias cefálicas. Os laudos do laboratório de patologia do HCPA foram analisados individualmente à procura do diagnóstico histológico que confirmasse adenocarcinoma de pâncreas e tecido pancreático normal. Vinte e um diagnósticos histológicos de adenocarcinoma de pâncreas foram encontrados, correspondendo conseqüentemente a vinte e um pacientes operados. Os demais diagnósticos histológicos, bem como sua freqüência nas gastroduodenopancreatectomias realizadas naquele período, estão listados na tabela 1.

Os blocos de parafina das peças cirúrgicas correspondentes, estocados no laboratório, forneceram material para confecção de novas lâminas que foram analisadas através da microscopia convencional e posteriormente submetidas à análise digital.

Tabela 1. Gastroduodenopancreatectomias cefálicas no HCPA (1988-1999)

Patologia	Número de casos
Adenocarcinoma de papila de Vater	27
Adenocarcinoma de pâncreas	21
Pancreatite crônica	11
Cistoadenoma pancreático	3
Colangiocarcinoma distal	3
Adenocarcinoma de duodeno	1
Tumor neuroendócrino em pâncreas	1
Linfoma de pâncreas	1
Cistoadenocarcinoma de pâncreas	1
Adenocarcinoma de vesícula biliar	1
Total	70

População estudada

Todos os casos de gastroduodenopancreatectomia cefálica por adenocarcinoma da cabeça do pâncreas no HCPA, no período de janeiro de 1988 a janeiro de 1999, foram incluídos no estudo. No entanto, em dois dos vinte e um casos, os blocos de parafina com o material para a análise não foram localizados. Assim, participaram do estudo efetivamente

dezenove espécimes para compor o grupo com adenocarcinoma de pâncreas. O grupo com tecido pancreático considerado normal foi constituído por sete casos. Este material, também proveniente de blocos de parafinas estocados no mesmo laboratório, foi obtido de espécimes cirúrgicos de gastroduodenopancreatectomia onde o diagnóstico histológico era de neoplasia de papila de Vater restrita a esta estrutura, sem comprometimento do tecido pancreático adjacente. Os demais casos de neoplasia de papila de Vater não puderam ser incluídos no estudo porque apresentavam comprometimento de outras estruturas, resultando em um estadió diferente. Um total de 26 peças deu origem a um grupo de mil e trezentos núcleos de células epiteliais ductais, nos quais procedeu-se a avaliação cariométrica.

Preparação do material

Foram confeccionadas lâminas conforme técnica convencional após cortes homogêneos de cinco micrômetros de espessura dos blocos de parafina que continham o material pancreático. Este foi previamente separado em dois grupos (neoplasia e normal) conforme o diagnóstico obtido dos laudos de anatomopatologia consultados. A coloração utilizada foi a de hematoxilina e eosina de Mayer (HE). O material foi cortado e corado em conjunto, para minimizar ou eliminar variações no seu preparo. As lâminas examinadas foram identificadas apenas com seu número de série do laboratório, de forma que não era conhecida nenhuma outra característica do material (estadiamento ou diferenciação tumoral) antes e durante a realização desta análise. Dois patologistas avaliaram as novas

lâminas e classificaram os tumores. Houve concordância entre as classificações prévias (contidas nos laudos) e as dos patologistas. Caso houvesse diferença entre as classificações, um terceiro patologista seria consultado e a classificação utilizada seria então a da maioria, incluindo a fornecida pelo laudo do laboratório.

Características de textura do DNA

Noventa e três características cariométricas da distribuição espacial e estatística da cromatina nuclear foram avaliadas através do sistema *TICAS*. Estas características estão listadas e detalhadas no anexo, seguindo uma ordem crescente de seus algarismos arábicos. Pelo fato de não terem sido utilizadas todas as 500 características existentes no sistema, as que aqui se apresentam não seguem uma numeração contínua (Anexo).

Aquisição e processamento das imagens

As células foram selecionadas com auxílio de um patologista experiente e posteriormente analisadas por programa de análise de imagem (Image ProPlus 4.1 – Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), acoplado a um sistema de digitalização. O sistema de digitalização é formado por um microscópio ótico com videocâmara, placa digitalizadora de imagem e microcomputador com sistema operacional Windows 98. As fórmulas

utilizadas para obtenção dos valores das características nucleares estudadas foram retiradas do Sistema *TICAS*, como mencionado anteriormente.

Mil e trezentos núcleos das células epiteliais foram avaliados de forma individual. Inicialmente, foi escolhida a área mais representativa de cada tumor, onde a necrose e os artefatos não afetavam a qualidade da imagem em um mesmo campo microscópico. Igualmente a melhor área de tecido pancreático normal foi selecionada. Em média, foram escolhidos quinze campos por caso, variando entre dez e trinta, dependendo das condições do material (Figuras 1 e 2). Nos campos escolhidos, e em um único plano focal com objetiva planoacromática de imersão de cinquenta aumentos, aproximadamente três núcleos eram visualizados e enfim, selecionados. Aleatoriamente, foram separados cinquenta núcleos de cada caso. Estas imagens foram gravadas em arquivos de imagem não compactados do computador, ou seja, arquivos que preservam a imagem de forma integral. Cada um dos cinquenta núcleos foi recortado destas imagens e enviado para um outro arquivo, também dentro do mesmo programa, contendo somente tais núcleos, sem citoplasma ou outros tipos de núcleos ao seu redor (Figura 3). Estes dois processos são conhecidos como captura e segmentação de imagens, respectivamente. Assim foram criados vinte e seis arquivos com os núcleos individualizados, nos quais procedeu-se a avaliação digital.

Figura 1. Campo microscópico. Tejido pancreático normal. HE, 400x no original.

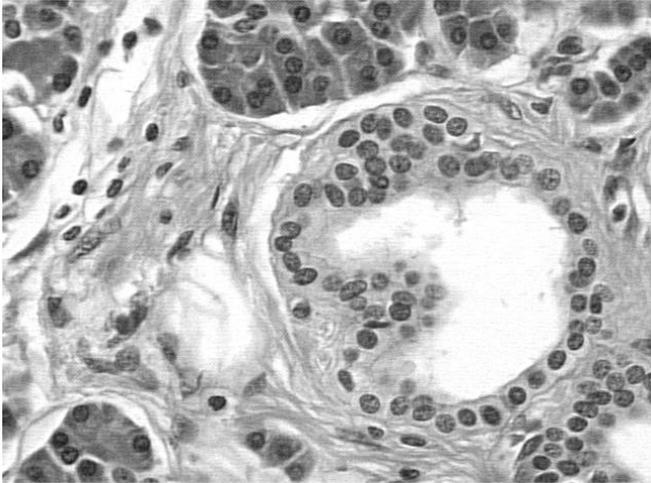


Figura 2. Campo microscópico. Tejido pancreático neoplásico. HE, 400x no original.

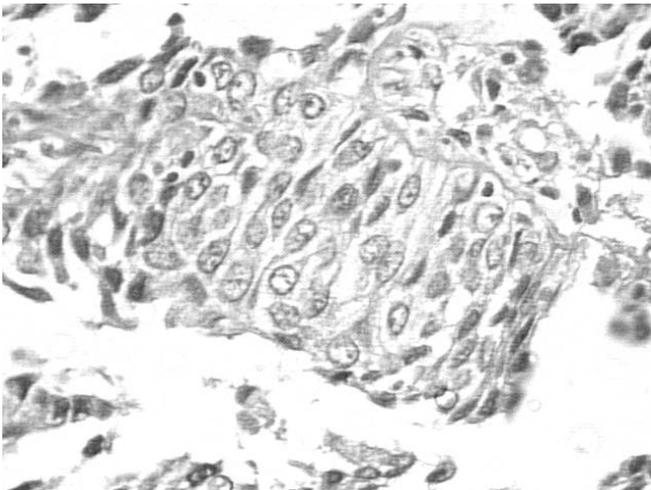
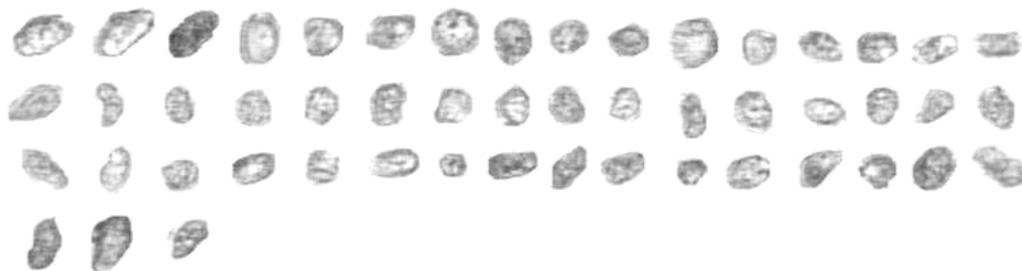


Figura 3. Archivo de núcleos segmentados. Tejido pancreático neoplásico. HE 400x no original.



A partir do sistema *TICAS*, foram geradas planilhas específicas para cada caso, com as informações de seus núcleos celulares. As colunas da planilha representam as características envolvidas na investigação. As linhas correspondem aos valores encontrados para cada um dos cinquenta núcleos em relação às características, sendo suas unidades arbitrárias, dependente da característica em questão, conforme exemplificado na tabela 2.

Tabela 2. Exemplo da tabela utilizada na investigação das características nucleares em cada arquivo de núcleos segmentados. Caso número 117811ca. Tecido neoplásico. Valores em unidades arbitrárias. Tabela parcial.

Núcleo	Área	RLM#278	RLM#266	Perimeter	Roundness	IOD	Fractal Dim.	Density (min)	Density (max)	Density (std.dev.)	Density 20%
01	877	424,78790	47,22007	143,85280	1,87770	161,28530	1,08966	0	0,49097	0,09590	0,39898
02	891	192,28510	45,37037	131,84770	1,55259	144,43050	1,06028	0	0,41380	0,10269	0,49825
03	993	44,79960	38,56898	127,60530	1,30490	112,81260	1,09519	0	0,46749	0,09297	0,57374
04	863	94,56663	37,17497	114,78920	1,21501	109,43780	1,10943	0	0,38451	0,06976	0,43070
05	817	144,48590	40,50306	119,23750	1,38482	148,60560	1,05515	0,03443	0,44521	0,07168	0,32916
06	918	327,88130	48,11220	129,94050	1,46364	145,80540	1,07010	0	0,36603	0,06666	0,39051
07	823	281,01820	48,82989	126,33820	1,54333	126,73510	1,07255	0	0,42402	0,10176	0,45497
08	778	560,74550	48,46915	108,69850	1,20853	121,37460	1,05632	0	0,43449	0,10435	0,41330
09	1052	379,68820	45,76616	146,07010	1,61397	169,64950	1,13837	0	0,39406	0,07871	0,31496

Caso número 117811ca

Delineamento do estudo

Um estudo transversal foi realizado através da determinação das características nucleares de espécimes cirúrgicos de adenocarcinoma de pâncreas e de tecido pancreático normal, resultantes de gastroduodenopancreatectomias cefálicas, armazenados em blocos de parafina e arquivados no Serviço de Patologia do HCPA.

Análise estatística

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado apenas para avaliar e selecionar, dentre as 93 características nucleares do Sistema *TICAS*, quais apresentavam valores diferentes entre os grupos. Nesta análise valores iguais a zero determinam que não existe diferença entre os dois tipos de tecido. Para todas as variáveis do banco de dados, ou seja, as que resultaram do teste de Kruskal-Wallis, foram calculados médias, desvios padrões e pontos de corte nos seus valores. Os grupos foram comparados através do teste t de Student para amostras independentes. O valor de z foi calculado somente para o grupo com neoplasia, uma vez que o grupo com tecido considerado normal foi quem forneceu os dados para tal cálculo. O valor z foi utilizado para confecção do histograma no grupo da neoplasia e para o cálculo da distância média padronizada da população normal (DMPPN), neste grupo. A forma de obtenção da DMPPN está demonstrada na tabela 3. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Os dados foram processados e analisados com auxílio do programa de computador SPSS versão 8.0.

Tabela 3. Distância média padronizada da população normal (DMPPN) em ambos os grupos. Onde, Σdp é a soma dos desvios padrões; Σz é a soma dos valores de z e 11 é o número total de características cariométricas envolvidas.

DMPPN	NORMAL	NEOPLASIA
SIGNIFICADO	Média dos valores dos desvios padrões submetidos à conversão	Média dos valores de z submetidos à conversão
EQUAÇÃO	Σdp das onze características \div 11	$\Sigma z \div 11$

Aspectos bioéticos

O estudo teve início após a aprovação de seu protocolo pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os pesquisadores comprometeram-se junto a este comitê com o sigilo das informações obtidas dos prontuários, reforçando que as mesmas seriam utilizadas exclusivamente para publicações científicas, preservando-se o anonimato dos pacientes. Em momento algum houve contato direto dos pacientes com os pesquisadores, ou mesmo qualquer outro tipo de envolvimento interpessoal. A pesquisa se restringiu a análise de material estocado no laboratório de patologia e dos prontuários médicos, sem que houvesse nenhum tipo de dano a integridade do paciente. Por estes motivos, a aplicação de formulário específico aos pacientes para seu consentimento na participação do estudo foi dispensada.

RESULTADOS

RESULTADOS

População estudada

O número total de espécimes cirúrgicos estudados foi 26, sendo 19 casos de adenocarcinoma de pâncreas e 7 de tecido pancreático considerado normal.

De cada um dos casos foram selecionados, aleatoriamente, 50 núcleos, totalizando mil e trezentos núcleos estudados, sendo 350 núcleos para o grupo normal e 950 para o grupo da neoplasia.

Características nucleares

Em cada um dos núcleos celulares foi avaliado um conjunto de 93 características cariométricas, escolhidas devido a sua frequência de ocorrência nos demais estudos que avaliam tecido epitelial glandular^{34,36,41,44}. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para definir as características cujas diferenças eram mais significantes. Desta análise, onze características foram selecionadas.

A onze características nucleares e suas abreviaturas, bem como o seu algarismo arábico correspondente, encontram-se descritas na tabela 4. As abreviaturas foram

utilizadas nas montagens das planilhas com a finalidade de facilitar sua digitação no momento da confecção das mesmas. As fórmulas que deram origem a estas características estão detalhadas no anexo. Suas unidades não foram representadas nas tabelas, tampouco nos gráficos.

Tabela 4. Características cariométricas e suas demais denominações utilizadas neste trabalho.

Característica cariométrica	Abreviatura	Algarismo Árábico
Área	ÁREA	2
RLM#278	RLM278	278
RLM#266	RLM266	266
Perimeter	PERIM	Derivada da 3
Roundness	ROUND	3
IOD	IOD	1
Fracdim	FRACDIM	400
Density (min.)	DENSMI	321
Density (max.)	DENSMA	319
Density (std. dev.)	DENSSD	Derivada da 312
Density 20%	DENS20P	318

Médias e desvios padrões das características nucleares

Foram determinadas médias e desvios padrões para as onze variáveis, relacionando-as com os dois tipos de tecido. A tabela 5 contém estes valores para os dois grupos com seus níveis de significância. Todos os resultados foram estatisticamente significativos com $P \leq 0,05$. Os gráficos 1 e 2 representam apenas os desvios padrões para as características nos grupos de tecido considerado normal e neoplásico, respectivamente. Os dados repetem parcialmente os da tabela 5. Os referidos gráficos foram elaborados com a intenção de exemplificar a disposição das características nucleares sem as devidas correções de escala, diferentemente da metodologia aplicada na confecção dos histogramas, que será abordada no item “Assinaturas digitais”, a seguir.

Tabela 5. Médias e desvios padrões das características nucleares nos dois grupos com seus níveis de significância. Unidades arbitrárias. $\alpha = 0,05$

Característica cariométrica	Tecido pancreático normal (n=350)		Adenocarcinoma de pâncreas (n=950)		<i>P</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
ÁREA	336,602	5,605	977,778	384,109	< 0,001
RLM278	97,071	0,567	353,230	84,450	< 0,001
RLM266	28,061	0,287	99,316	54,355	< 0,001
PERIM	65,054	0,410	125,584	31,213	< 0,001
ROUND	1,037	0,003	1,374	0,198	< 0,001
IOD	107,97	2,054	123,493	29,883	0,037
FRACDIM	1,045	0,012	1,217	0,202	0,002
DENSMI	0,136	0,010	0,010	0,023	< 0,001
DENSMA	0,622	0,007	0,533	0,188	0,050
DENSDD	0,098	0,003	0,250	0,256	0,018
DENS20P	0,326	0,015	0,491	1,150	< 0,001

Gráfico 1. Desvios padrões para as onze características do grupo de tecido pancreático normal. Unidades das características arbitrárias.

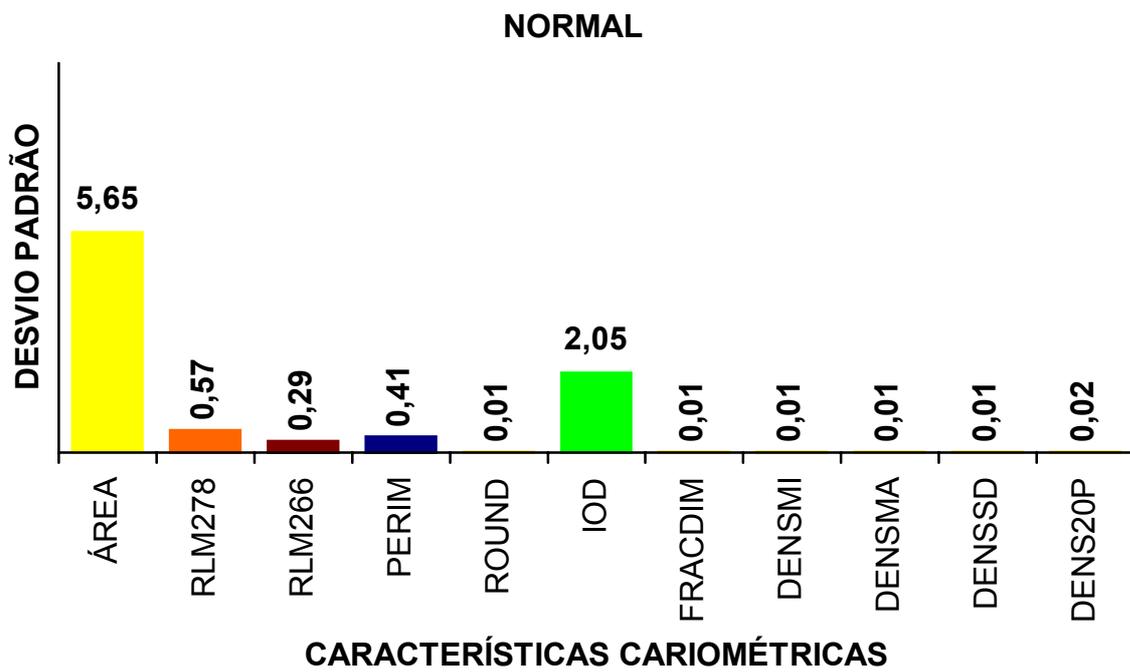
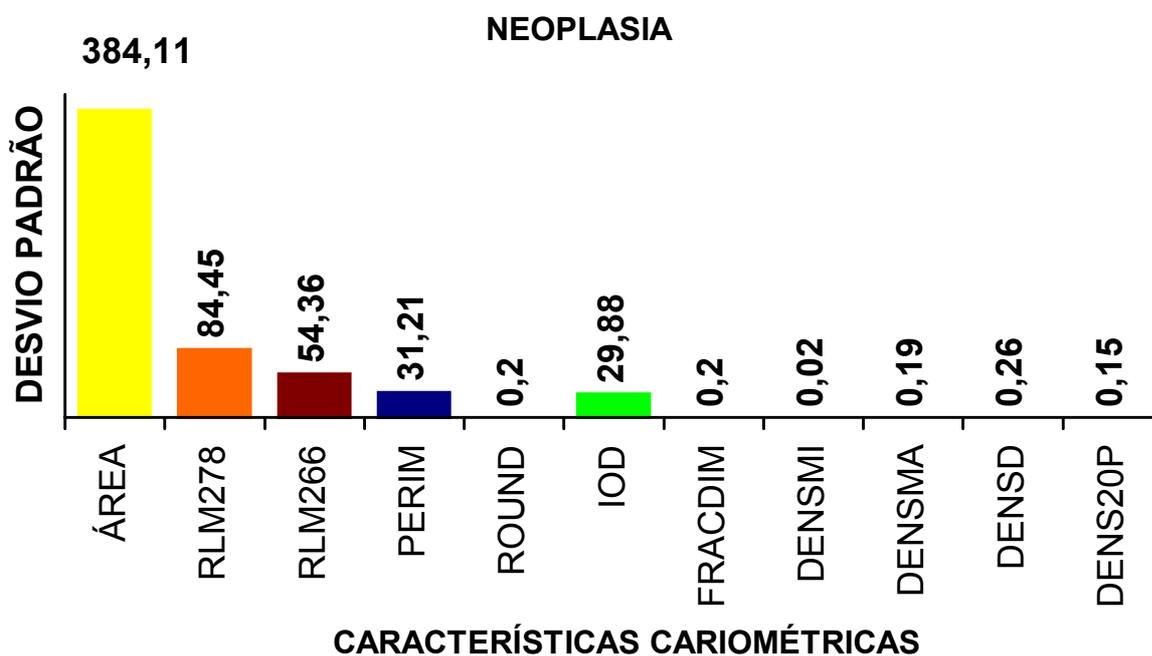


Gráfico 2. Desvios padrões para as onze características do grupo de tecido pancreático neoplásico. Unidades das características arbitrárias.



Pontos de corte

Foram avaliados pontos de corte nos valores das médias das onze características nucleares estudadas, sendo que para sete delas obteve-se discriminação entre os dois grupos de tecido. Os pontos de corte foram calculados entre os intervalos de valor mínimo, percentil 25, valor médio, percentil 75 e valor máximo, como são encontrados na tabela 6. Para as características *ÁREA*, *RLM278*, *RLM266*, *PERIM*, *ROUND*, *FRACDIM* E *DENSMI* foram estipulados marcadores de neoplasia. A tabela 7 contém estes valores.

Tabela 6. Intervalos nos valores das médias das características cariométricas em ambos os grupos. Valor mínimo, percentil 25, valor médio, percentil 75 e valor máximo. Unidades arbitrárias.

Características cariométricas	Valor min.	Percentil 25	Valor médio	Percentil 75	Valor max.
NORMAL (n=350)					
ÁREA	323,820	338,220	338,500	339,020	339,360
RLM278	96,157	96,662	97,086	97,545	97,856
RLM266	27,736	27,892	28,017	28,165	28,640
PERIM	64,270	64,915	65,106	65,337	65,523
ROUND	1,032	1,033	1,038	1,041	1,042
IOD	103,509	107,915	108,569	108,854	109,868
FRACDIM	1,036	1,038	1,041	1,043	1,073
DENSMI	0,112	0,138	0,139	0,140	0,141
DENSMA	0,617	0,618	0,620	0,622	0,639
DENSSD	0,094	0,095	0,097	0,099	0,105
DENS20P	0,313	0,319	0,321	0,324	0,361
NEOPLASIA (n=950)					
ÁREA	492,140	684,396	766,173	1466,483	1596,211
RLM278	105,270	333,435	356,806	419,477	430,801
RLM266	31,985	33,794	108,651	139,465	203,271
PERIM	81,519	99,577	112,916	163,106	171,235
ROUND	1,102	1,198	1,311	1,566	1,629
IOD	60,936	110,758	126,498	137,085	201,414
FRACDIM	1,075	1,079	1,093	1,438	1,595
DENSMI	0,001	0,001	0,002	0,004	0,088
DENSMA	0,284	0,394	0,441	0,757	0,866
DENSSD	0,057	0,079	0,084	0,604	0,635
DENS20P	0,317	0,398	0,413	0,668	0,781

Tabela 7. Intervalos de valor máximo e valor mínimo nas médias das sete características cariométricas que apresentaram discriminação entre o grupo de neoplasia e o de tecido pancreático considerado normal. A última coluna corresponde aos valores estipulados como indicadores de neoplasia. Unidades arbitrárias.

Característica cariométrica	NORMAL (n=350)		NEOPLASIA (n=950)		Indicadores de neoplasia
	Valor mínimo	Valor máximo	Valor mínimo	Valor máximo	
ÁREÁ	323,820	339,360	492,140	1596,211	$\geq 350,0$
RLM278	96,157	97,856	105,270	430,801	$\geq 100,0$
RLM266	27,736	28,640	31,985	203,271	$\geq 30,00$
PERIM	64,260	65,523	81,519	171,235	$\geq 70,00$
ROUND	1,032	1,042	1,10	1,62	$\geq 1,050$
FRACDIM	1,036	1,073	1,075	1,595	$\geq 1,074$
DENSMI	0,112	0,141	0,001	0,088	$\leq 0,100$

Assinaturas digitais e distância média padronizada da população normal

As assinaturas digitais foram representadas em histogramas utilizando-se os desvios padrões e os valores de z das características nucleares para o tecido considerado normal e para o neoplásico, respectivamente (Tabela 8). Uma escala com trinta unidades foi aplicada para melhor representação dos dados.

Tabela 8. Valores utilizados na confecção dos histogramas para ambos os grupos.

Unidades arbitrárias.

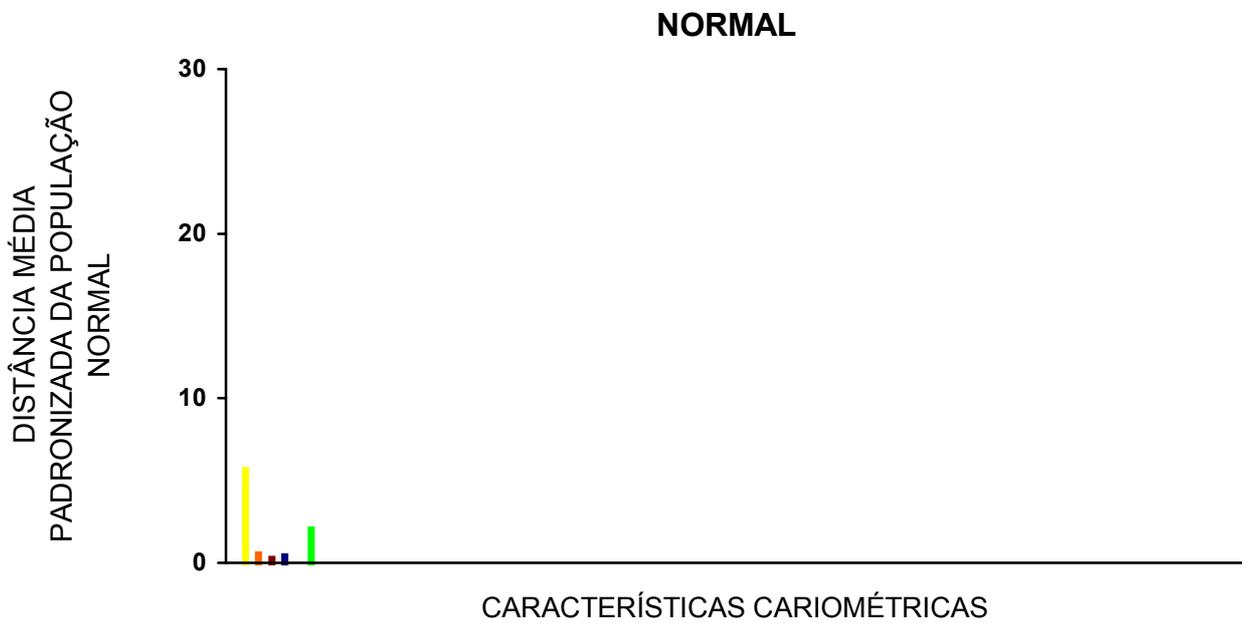
	NORMAL (n=350)	NEOPLASIA (n=950)
Característica cariométrica	Desvio Padrão	Valor de z
ÁREA	5,6505	67,9783
RLM278	0,5672	148,8926
RLM266	0,2872	189,2502
PERIM	0,4103	76,0694
ROUND	0,0036	55,0056
IOD	2,0548	14,5434
FRACDIM	0,0129	15,7170
DENSMI	0,0105	2,2500
DDENSMA	0,0077	24,4016
DENSSD	0,0037	70,0065
DENS20P	0,0157	9,6048

O histograma do grupo com tecido pancreático considerado normal encontra-se na figura 4. O eixo de X representa os valores do desvio padrão para as características em tais núcleos, escalonados em trinta unidades. O eixo Y se refere às características cariométricas. A ordem de apresentação destas características segue a mesma encontrada nos gráficos números 1 e 2.

Da mesma forma, na figura 5, está representado o histograma do grupo de tecido neoplásico.

Os valores das distâncias médias padronizadas da população normal foram obtidos conforme consta na tabela 3. Os valores da DMPPN para o grupo normal e neoplásico foram, respectivamente, 82,03 e 6.124,72.

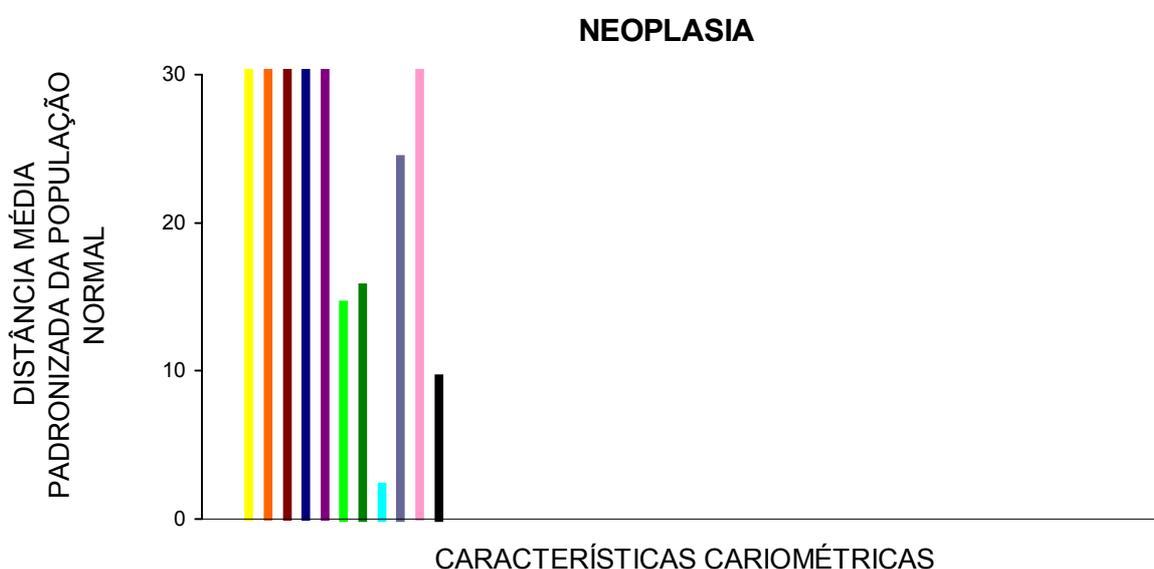
Figura 4. Histograma representativo da assinatura digital em núcleos normais e respectivo valor da DMPPN. Da esquerda para a direita temos: ÁREA, RLM278, RLMC266, PERIM, ROUND, IOD, FRACDIM, DENSMI, DENSMA, DENSSED, DENS20P. Escala com trinta unidades. Legenda de cores.



- ÁREA
- RLM278
- RLMC266
- PERIM
- ROUND
- IOD
- FRACDIM
- DENSMI
- DENSMA
- DENSSED
- DENS20P

DMPPN=82,03

Figura 5. Histograma representativo da assinatura digital em núcleos neoplásicos. Da esquerda para a direita temos: ÁREA, RLM278, RLM266, PERIM, ROUND, IOD, FRACDIM, DENSMI, DENSMA, DENS20P, seguindo a mesma disposição da do histograma para o tecido considerado normal. Escala com trinta unidades. Legenda de cores.



- ÁREA
- RLM278
- RLM266
- PERIM
- ROUND
- IOD
- FRACDIM
- DENSMI
- DENSMA
- DENS20P
- DENS20P

DMPPN= 6124,72

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os achados observados neste estudo estão em concordância com os resultados encontrados em outros órgãos^{33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49}. A assinatura digital dos núcleos de tecido pancreático neoplásico, no caso, do adenocarcinoma, mostrou-se substancialmente diferente da dos núcleos do tecido considerado normal, representando que a alteração no padrão de apresentação da cromatina destes núcleos está diretamente relacionada ao evento patológico. Os vários fatores envolvidos nestes resultados serão detalhados de uma forma mais minuciosa e crítica, a seguir.

População estudada

Trata-se de um estudo inicial com um número ainda reduzido de espécimes cirúrgicos. Em parte, o período restrito a 11 anos, determinado em virtude do tempo máximo em que há material arquivado em condições de uso no laboratório de patologia do HCPA, contribuiu para esta pequena casuística.

Para aumentar o poder do estudo acredita-se que outras fontes de material poderão ser adicionadas em uma futura coleta de dados.

Caso tivesse sido incluído material pancreático de pacientes que foram submetidos à cirurgia paliativa, obter-se-ia mais material para a análise, no entanto, a população se

tornaria heterogênea, principalmente no que diz respeito ao estadió destes pacientes. A inclusão de outros laboratórios de patologia como fonte alternativa de espécimes, poderia modificar este quadro. A grande Porto Alegre possui quatro Faculdades de Medicina, e no mínimo cinco hospitais que mantêm ensino para alunos de graduação e especialização, e que abrigam laboratórios de patologia. A integração entre estes estabelecimentos e seus profissionais poderia ser proveitosa neste e em vários outros aspectos. Ainda, o desenvolvimento de células em cultura de tecidos ou em cobaias imunodeficientes poderia se tornar outra importante fonte de material⁴, porém esta metodologia foge do propósito desta dissertação de mestrado, podendo ser utilizada em trabalhos em nível de doutorado.

Baak, em 1986, levantou os dados existentes em relação ao diagnóstico cariométrico de atipias nas hiperplasias endometriais, concluindo que a sensibilidade e a especificidade na classificação de tais lesões possuíam baixos valores. A cariometa estaria indicada apenas para casos selecionados onde a avaliação prognóstica seria o ponto de maior relevância, sempre associada à análise convencional por patologista experiente e, portanto não podendo jamais substituir esta última³⁸.

Em 2001, Bartels e colaboradores encontraram uma tendência na classificação de células endometriais em relação à sua progressão, entretanto, quando o material era avaliado individualizando-se os casos, eram expressas muitas diversidades nos arranjos das características cariométricas⁴¹. Em tal trabalho não foram apontadas sensibilidade e especificidade dos achados. Talvez o número de núcleos envolvidos (hum mil e quinhentos, no total) até tenha sido suficiente para verificação do grau de progressão da doença, mas não, para verificação de sensibilidade e de especificidade diagnósticas. Além

do que, cinco categorias diagnósticas estiveram envolvidas, o que reduziu o número total de núcleos por grupo, com conseqüente diminuição das potencialidades estatísticas.

Nota-se que decorridos quinze anos, a aplicação dos resultados ainda merece especial cuidado no que diz respeito à caracterização de processos patológicos envolvendo o endométrio, conforme visto nessas duas últimas referências. O número de casos avaliados poderia ser indicado como sendo o fator responsável por tais limitações.

Em relação ao tecido prostático, no entanto, Bartels estudou mais de três mil núcleos provenientes de quatro tipos distintos de categorias diagnósticas, e concluiu que existe uma modificação aparente nos padrões de apresentação da cromatina à medida em que se aproxima da neoplasia e se afasta do tecido normal. Foram avaliados núcleos de células de tecido normal, de tecido normal junto à neoplasia epitelial de baixo grau, de tecido normal junto à neoplasia epitelial de alto grau e junto ao adenocarcinoma. Com isso, ele mostrou que a assinatura digital apresenta uma grande potencialidade em desenvolver aptidões prognósticas³⁴. Mais uma vez, a sensibilidade e a especificidade do método não foram testadas.

Recentemente, Duval da Silva e seus colaboradores foram surpreendidos com o resultado de seu trabalho. A avaliação cariométrica da metaplasia esofágica conhecida como Esôfago de Barrett revelou que as alterações encontradas são muito mais próximas às do adenocarcinoma esofágico do que às da displasia de alto grau do esôfago, como era

esperado⁴¹. Duas questões ficaram sem resposta com este trabalho. Seria o grupo da displasia muito pequeno em número de casos além de muito heterogêneo para que as comparações tenham validade? Ou então, será a metaplasia realmente uma alteração mais agressiva do que até agora se acreditou que pudesse ser?

Somente outras pesquisas com um número mais expressivo de casos por categoria diagnóstica poderão esclarecer tais dúvidas.

No trabalho que aqui se discute, acredita-se que para a obtenção de resultados com sensibilidade e especificidade aceitáveis seria recomendável a análise de um número mais expressivo de casos, com conseqüente aumento do número de núcleos celulares em cada grupo.

Em relação à formação dos grupos do estudo, e principalmente a do grupo controle, o comentário que cabe ser feito é a respeito da origem do tecido pancreático considerado normal. Levando-se em consideração aspectos éticos e técnicos para aquisição do material pancreático normal, uma vez conhecida a alta morbidade a que pacientes sadios seriam submetidos com a coleta do material, e a dificuldade de acesso aos pacientes que chegam à necropsia ou que vão à doação de órgãos, optou-se por utilizar o material igualmente estocado em parafina nos arquivos do Serviço de Patologia do HCPA. Este material também é derivado de duodenopancreatectomias cefálicas realizadas nos últimos onze anos do início do trabalho. A literatura e os centros mundiais de atendimento médico oncológico reconhecem que o tratamento padrão nos estádios iniciais das neoplasias periampolares (adenocarcinoma de pâncreas, adenocarcinoma de papila de Vater, colangiocarcinoma distal e adenocarcinoma de duodeno) é a duodenopancreatectomia cefálica^{3,6,29}. Os

espécimes utilizados foram então os que apresentavam o diagnóstico de neoplasia de papila de Vater (adenocarcinoma) com estágio I. Histologicamente o tecido pancreático da peça cirúrgica foi considerado normal. Entretanto, este tecido pancreático dito normal provém de pacientes com diagnóstico de um tumor maligno, sendo coletado de zona não comprometida pela neoplasia, mas próxima a essa. Os tumores periampolares induzem uma proeminente reação desmoplásica estromal no pâncreas junto às células cancerosas. Tal alteração não é considerada neoplásica, mas modifica a estrutura do tecido normal^{2,4}. Por este motivo, uma denominação mais apropriada seria a de "tecido pancreático sem alterações celulares neoplásicas" e não, normal. Nas tabelas, gráficos ou figuras deste texto, o referido tecido recebe a denominação de normal, para simplificar a confecção e a compreensão dos mesmos.

Os espécimes do grupo com neoplasia apresentavam diagnóstico de adenocarcinoma de cabeça de pâncreas com margens de ressecção livres de tumor, conforme esperado, já que estas cirurgias foram realizadas com intenção curativa.

Importante também é a lembrança de que quatro níveis de diferenciação celular são utilizados em histologia para tumores de pâncreas. Eles podem ser bem diferenciados, moderadamente diferenciados ou pouco diferenciados, sendo um número muito pequeno considerado anaplásico^{2,59}. A diferenciação celular para os tumores do estudo, no entanto não foi utilizada como variável diagnóstica, porque a maior parte dos espécimes cirúrgicos tinha diferenciação celular moderada, e o restante dos espécimes, pouca diferenciação, o que acompanha os achados da literatura^{2,59}. O número de casos implicaria no poder

diagnóstico do estudo e provavelmente os achados seriam de pouca relevância.

Outro fator que pode ser discutido é a aplicação dos resultados deste trabalho em relação à sobrevida dos pacientes na busca de novos fatores prognósticos. Para esta finalidade, o número de casos avaliados, associado à taxa de mortalidade cirúrgica obtida no início do estudo, também não é suficiente. Estes resultados fortaleceram a idéia de que uma equipe especializada em tratamento do câncer de pâncreas, centralizando os casos e buscando resultados cada vez melhores, devesse existir no HCPA, até por ser esse, um dos locais de referência no estado do Rio Grande do Sul para tratamento dos pacientes com tais patologias. Há aproximadamente quatro anos, os casos cirúrgicos de patologia pancreática passaram a ser acompanhados preferencialmente por apenas uma equipe médica, onde a maior parte de seus integrantes é fixa e treinada em cirurgia do pâncreas. A mortalidade em questão já mostra queda significativa no seu valor, e espera-se chegar aos índices de referência mundial dos centros especializados que não ultrapassam 2%. Portanto, com o aumento do número de doentes com câncer de pâncreas tratados no HCPA (através da divulgação desse serviço), e com a diminuição da mortalidade operatória, espera-se que esse trabalho servira de modelo para futuros estudos que queiram avaliar a sobrevida e o papel prognóstico da cariométrica nos tumores pancreáticos.

Preparação do material

Uma grande parcela dos estudos que avaliam as características nucleares prepara seu material para análise histológica utilizando uma coloração específica para o núcleo, também dita estequiométrica ^{42,53}. Esta coloração recebe o nome de reação de Feulgen e tem a vantagem de corar somente o material de interesse. Pode, no entanto, originar artefatos com muita frequência, dependentes principalmente da falta de treinamento na técnica de coloração ou até mesmo das variações da fixação do material ³². Outros pesquisadores utilizam coloração de hematoxilina e eosina de Meyer ^{36,41,44}, e o fazem porque consideram a confecção das lâminas com este corante, um processo mais fácil, além de disponível em boa qualidade na maior parte dos laboratórios e mais econômico. No presente estudo a coloração de Feulgen foi tentada em três laboratórios de patologia, incluindo um laboratório situado no Arizona, EUA, para onde o material foi enviado. Em nenhum destes estabelecimentos foi conseguida uma coloração uniforme entre todas as lâminas, sempre com resultados insatisfatórios. Provavelmente o problema deva ter sido relacionado à irregularidade da fixação prévia destes materiais, já que no decorrer dos onze anos de armazenamento do material não havia o controle ou padronização em relação à concentração dos fixadores (ex: formalina), como é empregado nos dias de hoje. A coloração por hematoxilina e eosina foi então aplicada sem nenhum prejuízo à análise desejada.

Assinaturas digitais

O papel das anormalidades cromossômicas no processo da carcinogênese tem sido cada vez mais reforçado com o advento da biologia molecular.

Iniciado pelo estudo da quantidade de cromatina, ou seja, ploidia celular, a aplicação da cariometria digital tem se tornado um importante fator preditivo em relação ao prognóstico de certos tumores^{33,34,35}. Os avanços em inteligência artificial propiciaram a formação de novos parâmetros passíveis de investigação sem aumento da indumentária envolvida no processamento do material. A confecção do material para estudo histológico permanece a mesma, apenas é aplicada tecnologia no momento de sua análise. Tecnologia esta que deixa de ser dispendiosa no ponto de vista econômico a partir do momento em que menor tempo é gasto para resultados mais confiáveis e precisos. Com isso, são plenamente alcançados os objetivos da quantificação em patologia: acrescentar objetividade à avaliação dos casos e utilizar métodos capazes de aumentar o poder diagnóstico, prognóstico e possivelmente terapêutico.

Muitos estudos, utilizando-se os mais diversos tipos de tecido biológico vêm sendo desenvolvidos em vários países. Dos Estados Unidos à Bélgica, passando pela Espanha, Itália e Brasil, o propósito tem sido o mesmo, apenas com enfoques um pouco diferentes. Mais de dez tipos de tecido já foram submetidos à avaliação cariométrica por análise digital como o tecido prostático^{32,33,34,35}, tecido mamário^{36,37}, o endométrio^{38,39,40,41}, o da

cérvice uterina ⁴², o do intestino grosso ⁴³, o do esôfago ^{43,44}, o da laringe ⁴⁵, o muscular ⁴⁶, o da glândula adrenal ⁴⁷ e o da papila de Vater ⁴⁹. Em todos os estudos a avaliação quantitativa do arranjo espacial do DNA foi alcançada com sucesso, possibilitando a distinção entre alterações patológicas e parâmetros normais.

Nosso trabalho também mostrou capacidade em diferenciar núcleos de tecido pancreático considerado normal dos de tecido pancreático tumoral através da cariometria digital. As onze características avaliadas do Sistema *TICAS*, não só obtiveram valores diferentes para os dois grupos com significância estatística, mas também, sete delas, serviram como marcadores de neoplasia.

Neste trabalho, os marcadores foram considerados como discriminantes perfeitos dos dois grupos, entretanto acreditamos que tal propriedade deveria ser novamente testada em um número maior de casos.

Nos histogramas, há um padrão nitidamente diferente entre os dois grupos: no grupo da neoplasia o histograma mostra valores altos em quase todas as características, o que significa que tais valores se distanciam muito dos valores considerados normais, o que não ocorre no outro grupo. Estes dados podem ser melhor compreendidos observando-se os valores encontrados para as distâncias médias padronizadas da população normal. No tecido considerado normal a DMPPN foi de 82,03 unidades, já a do tecido neoplásico foi de 6.124,72. A diferença entre os grupos foi então de 6.042,69 unidades. Igualmente ao que ocorre na microscopia óptica onde os núcleos neoplásicos aparecem de forma bizarra ao

exame, na sua avaliação cariométrica eles possuem uma discrepância grande nos seus valores, como pode ser verificado.

Finalmente, por ser o núcleo a principal base para a interpretação em microscopia quando a arquitetura tecidual não está presente, como ocorre na citologia, este trabalho deve contribuir para o desenvolvimento e difusão de outras formas de processamento do material pancreático, ainda não utilizadas de rotina. Os achados podem ser aplicados nos estudos de citologia de material colhido do ducto pancreático principal através de lavados ou escovados, obtidos durante e pancreatografia endoscópica retrógrada. Ou ainda, em preparados histológicos de biópsias transduodenais dirigidas ao tecido pancreático durante a ultrassonografia endoscópica, aumentando a acurácia diagnóstica desses métodos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O estudo permitiu a caracterização dos núcleos de células pancreáticas normais e neoplásicas através da cariometria analisada por sistema digital, criando uma assinatura digital específica para os núcleos do tecido considerado normal e para os da neoplasia.

Sete características nucleares servem como marcadores de adenocarcinoma de pâncreas quando a técnica de cariometria digital é aplicada. São elas: "ÁREA, RLM278, RLM266, PERIM, ROUND, FRACDIM e DENSMI."

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Este trabalho abre espaço para futuras pesquisas na área de patologias pancreáticas, principalmente em avaliações diagnósticas e prognósticas, como mencionado na discussão. Sua metodologia foi testada e seus resultados servem como base para o planejamento de novos modelos dentro do estudo da cariometria.

Os avanços em biologia molecular vêm tentando modificar a abordagem aos pacientes com neoplasia de pâncreas. Por enquanto, apenas foram descritos genes que podem servir como marcadores de neoplasia pancreática. O impacto disso, entretanto, na literatura e na vida médica mostra claramente que todos (pesquisadores, médicos e pacientes) compartilham da mesma idéia: em breve novas descobertas valiosas hão de acontecer. Como consequência desse fato, e associando-se os resultados obtidos neste trabalho, decidiu-se estabelecer um protocolo voltado à avaliação clínica prospectiva dos pacientes com neoplasia pancreática, enfocando a coleta de material para pesquisa em biologia molecular. O Programa de Pós-graduação em Cirurgia, em conjunto com o Serviço de Genética do HCPA, criou o primeiro banco de material pancreático humano do Estado, intitulado "Banco de Dados e de Material Biológico para Pesquisa em Câncer de Pâncreas". A estrutura foi montada e já se encontra em funcionamento.

ANEXO

ANEXO

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. Há a descrição de mais de 93 características no anexo para facilitar o entendimento já que algumas podem completar outras.

Característica 1: Extinção total ou Densidade óptica total (DOT) ou IOD. 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*.

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

(i, j) in N

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 *pixels*.

Área = área em número de *pixels*

Característica 3: Circularidade nuclear - *roundness*. Medida da semelhança do núcleo com relação à forma de um círculo.

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

Estruturas perfeitamente circulares terão a circularidade igual a 1.

Característica 6: RMS - *Root mean squared* (230):

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

(i, j) in N

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

(i, j) in N

A = Área

$$RMS = \sqrt{\frac{Ext2 - \frac{ExtSum^2}{A}}{ExtSum}}$$

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

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

Para a posição de cada *pixel* (i, j) no núcleo, calcular:

$$OD = \text{int} (I [i] [j] / 10.0 + 0.5)$$

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

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 exhibe 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 232 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 unidade 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 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 $\{2, 4, 6, 8, 10, 12\}$

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

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

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

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

$$\begin{aligned}
 & i = 1 \quad j = 1 \\
 & 6 \quad 6 \\
 \text{TMP 5} = & \sum_{j=1}^6 \left[\sum_{i=1}^6 \text{rlh} [i] [j] \right]^2
 \end{aligned}$$

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

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

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

$$\text{SRE} = \text{TMP2} / \text{TMP1}$$

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

$$\text{LRE} = \text{TMP3} / \text{TMP1}$$

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

$$\text{GLN} = \text{TMP4} / \text{TMP1}$$

Característica 306: Desuniformidade de comprimento de seqüência

(Run Length Nonuniformity)

$$\text{RLN} = \text{TMP5} / \text{TMP1}$$

Característica 307: Percentuais de Seqüências (Run Percentage)

$$\text{RP} = \text{TMP1} / A$$

Comentário: todos os valores são normalizados pelo número de seqüências nos limites nucleares. As ênfases em seqüências curtas e longas são autoexplicatórias: os 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 valor médio em valores de cinza
(av20a).

Características envolvendo densidade óptica:

Heterogeneidade:

$$h1 = \frac{N_b + N_w}{N_t}$$

Onde:

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

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

N_t = total de *pixels* no núcleo.

Característica 312: Heterogeneidade. HET = h1

$$h2 = \frac{N_g}{N_t}$$

N_g = número de *pixels* em diferentes tons de cinza, correspondendo ao valor médio

N_t = como definido acima.

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

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

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

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

nw = número de *pixels* brancos no mesmo conjunto.

| | = valor absoluto

à seguir, o valor cl deve ser definido:

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

onde,

tm = número total de conjuntos encontrados no núcleo.

Logo,

Característica 314: *Clumpness*

$$\text{cl} = \text{cl} / \text{nb} + \text{nw}$$

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 na 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*):

$$\text{cond} = \text{cl} / \text{nt}$$

O valor médio é definido como:

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

Logo,

Característica 316: Densidade óptica 20% abaixo do valor médio em valores de cinza

(av20b):

$$\text{av20b} = 0,8 * \mu$$

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

$$\text{avext} = \mu$$

Característica 318: Densidade óptica 20% acima do valor médio em valores de cinza

(av20a):

$$\text{av20a} = 1.2 * \mu$$

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

}

Característica 400: Dimensão fractal:

Fracdim = $\frac{\log(\text{número de } \textit{pixels} \text{ similares})}{\log(\text{do fator de magnificação})}$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castillo CF, Warshaw AL. Pancreatic Cancer. Em: Morris PJ, Malt RA. Oxford Textbook of Surgery, Oxford, New York: Oxford University Press Inc; 1994. p. 1309-16.
2. Solcia E, Capella C, Klöppel G. Atlas of Tumor Pathology – Tumors of the pancreas. 3. ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology (AFIP); 1997. p. 247-255.
3. Rosewicz S, Wiedenmann B. Pancreatic carcinoma. Lancet 1997; 349:485-89.
4. Yeo CJ, Cameron JL, Shin TA, Lillemoe KD, Pitt HA, Talamini MA, Hurban RH, Ord SE, Sauter PK, Coleman J, Zahurak ML, Grochow LB, Abrams RA. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications and outcomes. Ann Surg 1997; 266: 248-57.
5. Yeo CJ, Conlon KC, Sarr MG, Lillemoe KD, Evans DB, Jaffee. Pancreatic Cancer: 1998 Update. J Am Col Surg 1998; 187: 429-42.
6. Cameron JL. Pancreatic cancer – state of the art. Cancer J Clin 2000; 74: 241-68.
7. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2000 - Rio Grande do Sul: <http://www.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/dyrs.def>
8. Hruban R. Can we screen high-risk individuals to detect early pancreatic cancer? J Surg Oncol 2000; 74: 243-8.

9. Gullo L, Migliori PT, Casadei R, Marrano D. Do early symptoms of pancreatic cancer exist that can allow an earlier diagnosis? *Pancreas* 2001; 22: 210-3.
10. Farnell MB, Nagorney DM, Sarr MG. The Mayo clinic approach to the surgical treatment of adenocarcinoma of the pancreas. *Surg Clin North Am* 2001; 81: 611-23.
11. Endo Y, Morii T, Tamura H, Okuda S. Cytodiagnosis of pancreatic malignant tumors by aspiration, using a duodenal fiberscope. *Gastroent* 1974; 67: 944-51.
12. Voss M, Hammel P, Molas G, Palazzo L, Dancour A, O'Toole D, Terris B, Degott C, Bernardes P, Ruzzniewski P. Value of endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of solid pancreatic masses. *Gut* 2000; 46: 244-9.
13. Stewart CJ, Mills PR, Carter R, O'Donohue J, Fullarton G, Imrie CW, Murray WR. Brush cytology in the assessment of pancreatobiliary strictures: a review of 406 cases. *J Clin Pathol* 2001; 54: 449-55.
14. Randall EB. Tumor markers and fine needle aspiration. Controversies and clinical challenges in pancreatic disease. American Gastroenterological Association - 1998. Digestive Disease Week Postgraduate Course. Ernest N. Memorial Convention Center. New Orleans, Los Angeles; 1998. p. 225-34.
15. Mann DV, Edwards R, Ho S, Lou WY, Glazer G. Elevated tumor marker CA 19-9: Clinical interpretation and influence of obstructive jaundice. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 474-9.

16. Nakamura Y, Onda M, Uchida E. Analysis of K-ras codon 12 point mutations using duodenal lavage fluid for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Pancreas* 1999; 18: 133-40.
17. Kawahira H, Kobayashi S, Kaneko K, Asano T, Ochiai T. p53 protein expression in intraductal papillary mucinous tumors (IPMT) of the pancreas as an indicator of tumor malignancy. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 973-7.
18. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Ranzani GN. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 1994; 54: 1556-60.
19. American Joint Committee on Cancer: AAJC Cancer Staging Manual, 5. ed. Philadelphia, Pa:Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 121-6.
20. Magistrelli P, Antoniori A, Crucitti A, La Greca A, Masetti R, Coppola R, Nuzzo G, Picciocchi A. Prognostic factors after surgical resection for pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol* 2000; 74: 36-40.
21. Cooperman AM, Kini S, Snady H, Bruckner H, Chamberlain RS. Current surgical therapy for carcinoma of the pancreas. *J Clin Gastroenterol* 2000; 31: 107-13.
22. Kurtz JE, Kohser F, Negrier S, Trillet-Lenoir V, Walter S, Limacher JM, Untereiner M, Kayitalire L, Jaeck D, Dufour P. Gemcitabine and protected 5-FU for advanced pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1450-3.

23. Rauch DP, Maurer CA, Aebi S, Pampallona S, Friess H, Ludwig CU, Buchler MW, Borner MM. Activity of Gemcitabine and continuous infusion fluorouracil in advanced pancreatic cancer. *Oncol* 2001; 60: 43-8.
24. Shoup M, Hodul P, Aranha GV, Choe D, Olson M, Leya J, Losurdo J. Defining a role for endoscopic ultrasound in staging periampullary tumors. *Am J Surg* 2000; 179: 453-6.
25. Cooperman AM. Pancreatic cancer: the bigger picture. *Surg Clin North Am* 2001; 81: 557-74.
26. Geenen JE. Cancer of the Pancreas: Is stenting useful in operable patients? Controversies and Clinical Challenges in Pancreatic Disease. American Gastroenterological Association – 1998 Digestive Disease Week Postgraduate Course. Ernest N. Memorial Convention Center, New Orleans, Los Angeles; 1998. p. 237-42.
27. Rattner D. Stenting is not useful in operable patients with Pancreatic cancer. Controversies and Clinical Challenges in Pancreatic Disease. American Gastroenterological Association – 1998 Digestive Disease Week Postgraduate Course. Ernest N. Memorial Convention Center, New Orleans, Los Angeles; 1998. p. 243-8.
28. Cohen SA, Siegel JH. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography and the pancreas: when and why? *Surg Clin North Am* 2001; 81: 321-8.

29. Bouvet M, Gamagami RA, Gilpin EA, Romeo O, Sasson A, Easter DW, Moosa AR. Factors influencing survival after resection for periampullary neoplasms. *Am J Surg* 2000; 180: 13-7.
30. Allison DC, Piantadosi S, Hurban RH, Dooley WC, Fishman EK, Yeo CJ, Lillemoe KD, Pitt HÁ, Lin P, Cameron JL. DNA content and other factors associated with ten-year survival after resection of pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol* 1998; 67: 151-9.
31. Smith- Mensah WH, Allison DC. Other Prognostic Factors. In: *Tumor of the exocrine pancreas* 1998: 491-5.
32. Silva VD. Caracterização de lesões nucleares celulares neoplásicas por método de assinatura digital [tese de doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
33. Bartels PH, Silva VD, 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: 389-96.
34. Bartels PH, Silva VD, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L, Bartels, HG. Chromatin texture signatures in nuclei from prostate lesions. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; 20: 407-16.
35. Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amim MB, Cohen M, Crawford D, Gospodarowicz M, Kaplan RS, Miller DS, Montironi R, Pajak TF, Pollack A, Srigley JR, Yarbrow JW. Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Med* 2000; 124: 995-1000.

36. Mariuzzi L, Mombello A, Rucco V, Morelli L, Zamo A, Thompson D, Vaught L, Bartels HG, Mariuzzi G, Bartels PH. Quantitative study of ductal breast cancer progression: signatures of nuclei in proliferating breast lesions and in situ cancer. *Adv Clin Path* 2000; 4: 87-97.
37. Tahlan A, Nijhawan R, Joshi K. Grading of ductal breast carcinoma by cytomorphology and image morphometry with histologic correlation. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22: 193-8.
38. Baak JP. Further evaluation of the practical applicability of nuclear morphometry for prediction of the outcome of atypical endometrial hyperplasia. *Anal Quant Cytol Histol* 1986; 8: 46-8.
39. Artacho-Perula E, Roldan-Villalobos R, Roldan-Villalobos AM, Vaamonde-Lemos R. Histomorphometry of normal and abnormal endometrial samples. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 173-9.
40. Artacho-Perula E, Roldan-Villalobos R. Evaluation of volume-weighted mean nuclear volume in endometrial lesions. *Histol Histopathol* 1993; 8: 443-8.
41. Bartels PH, Garcia FA, Davis J, da Silva VD, Bartels HG, Thompson D, Alberts DS. Progression curves for endometrial lesions. *Anal Quant Cytol Histol* 2001; 23: 1-8.
42. Weyn B, Tjalma W, Van De Wouwer G, Van Deale A, Scheunders P, Jacob W, Van Marck E. Validation of nuclear texture, density, morphometry and tissue syntactic structure analysis as prognosticators of cervical carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22: 373-82.

43. Weyn B, Jacob W, da Silva VD, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, Bartels HG, Van Daele A, Dillon K, Bartels PH. Data representation and reduction for chromatin texture in nuclei from premalignant prostatic, esophageal and colonic lesions. *Cytometry* 2000; 41: 133-8.
44. da Silva VD, Prolla JC, Sharma P, Sampliner R, Thompson D, Bartels PH. Karyometry in Barrett's esophagus. *Anal Quant Cytol Histol* 2001; 23: 40-6.
45. Dreyer T, Knoblauch I, Garner D, Doudkine A, MacAulay C, Palcic B, Popella C. Specific changes of chromatin structure in nuclei of normal epithelium adjacent to laryngeal squamous cell carcinoma. A preliminary study of 82 cases. *Anal Cell Pathol* 2000; 20: 141-50.
46. Dufer J, Poupon MF, Yatouji S. Nuclear DNA content and chromatin pattern of rat rhabdomyosarcoma cell sublines with different metastatic potentials. *Anal Cell Pathol*. 2000; 20: 41-8.
47. Scarparelli M, Baccarini MG, Colanzi P, Arnaldi G, Montironi R, Thompson D, Bartels PH. Chromatin texture analysis of cortical adrenal gland adenomas, including incidentalomas and adjacent normal-appearing cortical tissue. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22: 235-43.
48. Weyn B, Van De Wouwer G, Koprowsky M, Van Deale A, Dhaene K, Scheunders P, Jacob W, Van Marck E. Value of morphometry, texture analysis, densitometry and histometry in the differential diagnosis and prognosis of malignant mesothelioma. *J Pathol* 1999; 189: 581-9.

49. Hittel AB, Yeaton P, Decaestecker C, Rummelink M, Nagy n, Cremer M, Salmon I, Kiss R, Bourgeois N. Discrimination between dysplastic and malignant epithelium of the ampulla of Vater based on quantitative image cytometric data. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22: 98-106.
50. Weger AR, Glaser KS, Schwab G, Oefner D, Bodner E, Auer GU, Mikus G. Quantitative nuclear DNA content in fine needle aspirates of pancreatic cancer. *Gut* 1991; 32: 325-8.
51. Duval da Silva V. Digital video microscopy in pathology. *Pathologica* 1999; 91: 124-7.
52. Bartels PH, Montironi R, Duval da Silva V, Hamilt n PW, Thompson D, Vaught L, Bartels HG. Tissue architecture analysis in prostate cancer and its precursors: An innovation approach to computerized histometry. *Eur Urol* 1999; 35: 484-91.
53. Ross JS. Background, basic principles and techniques. Em Ross JS, editor. *DNA ploidy and cell analysis in pathology*. Tokyo: Igaku-Shoin. 1996:1-27.
54. Weibel ER. Stereological methods. In: Weibel ER, editor. *Stereological methods: practical methods for biological morphometry*. New York: Academic Press; 1980.
55. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 857-881.

56. Longatto Filho A, Santinelli A, Montironi R. Chromatin texture by computer-assisted image analysis. *Pathologica* 2000; 92: 94-5.
57. Weid GL, Bartels PH, Bahr GF, Oldfield DG. Taxonomic Intra-Cellular Analytic System (TICAS) for Cell Identification. *Acta Cytol* 1968; 12: 180-204.
58. SigmaScan®Proplus: <http://www.spsscience.com/sigmascan/index.cfm>
59. Bogomoletz WV, Oertel JE. Tumors of the exocrine pancreas. Em: Fletcher CDM. *Diagnostic histopathology of tumors*, London: Churchill Living Stone; 1995. p. 321-32.