

VINICIUS DUVAL DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES E NÚCLEOS CELULARES
NEOPLÁSICOS POR MÉTODO DE ASSINATURA DIGITAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina na área de concentração em Pneumologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do grau de Doutor.

Orientadores:

Prof. Dr. João Carlos Prolla

Prof. Dr. Peter H. Bartels

Porto Alegre

1999

Tese defendida em 9 de julho de 1999. Conceito: A

S586c Silva, Vinicius Duval da

Caracterização de lesões e núcleos celulares neoplásicos por método de assinatura digital / Vinicius Duval da Silva; orient. João Carlos Prolla; co-orient. Peter H. Bartels. – Porto Alegre : UFRGS, 1999.
138 fls. : il. color.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-graduação em Medicina : Pneumologia.

Carcinoma da próstata. 2. Carcinoma com invasão precoce. 3. Lesões pré-neoplásicas. 4. Análise quantitativa : Patologia. I. Prolla, João Carlos. II Bartels, Peter H. III. Título.

NLM: QZ 241

Catálogo: Biblioteca FAMED / HCPA

Para meus pais, Paulo Marcos e Eliana
e meu avô, Reverendo e Professor
Nataniel Duval da Silva (*in memoriam*)

Agradecimentos

Aos orientadores Profs. Drs. Peter H. Bartels e João Carlos Prolla, por compartilharem seus conhecimentos e experiências, oferecendo oportunidades e exercendo influências decisivas em minha formação.

Ao Prof. Rodolfo Montironi, MD, F.R.C. Path, Diretor do Departamento de Patologia da Universidade de Ancona, Itália, pelas discussões sobre patologia prostática e também pelo fornecimento de material histológico e informações clínicas utilizadas no estudo.

À Deborah Thompson, Linda Vaught, Hubert G. Bartels e Robert Kingston, pela camaradagem e suporte inestimáveis em Tucson, Arizona.

Aos colegas Prof. David Alberts, MD, Vice-Diretor do Arizona Cancer Center e Prof. John Davis, MD pelas sugestões sobre esse projeto.

Aos Profs. Drs. Renato Stein e Sérgio Mendes pelo apoio em Tucson.

Aos Profs. Drs. Antônio Carlos Kruehl Pütten, Chefe do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Maria Isabel A. Edelweiss, pelo incentivo desde meu período de residência médica no HCPA.

Aos colegas de residência médica Drs. Luíse Meurer e Rogério M. Chultz.

Ao Sr. Marco Aurélio da Silva, Secretário do Curso de Pós-graduação em Medicina: Pneumologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto.

Agradeço ainda às seguintes instituições:

Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasília, pelo apoio financeiro a este trabalho.

National Institutes of Health, National Cancer Institute, EUA, pela permissão de uso de equipamentos e programas de computador.

Universidade do Arizona em Tucson, EUA e seus departamentos e institutos, em especial: Optical Sciences Center, Health Sciences Center, Cancer Center e Health Sciences Library;

Departamento de Anatomia Patológica da Universidade de Ancona, Itália;

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente o Curso de Pós-graduação em Medicina-Pneumologia e Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO, 1.

- 1.1 A matriz nuclear como base estrutural para a função do genoma, 1.
- 1.2 A matriz nuclear nas neoplasias malignas, 8.
- 1.3 Quantificação em Patologia, 9.
- 1.4 Conceitos e história da microfotometria, estereologia e microfotometria, 13.
- 1.5 Análise de imagem digital, 21.
- 1.6 Novas abordagens, 34.
- 1.7 Sistemas complexos, 42

OBJETIVOS, 45.

- 2.1 Objetivo geral, 45.
- 2.2 Objetivo específico, 45.

MATERIAL E MÉTODOS, 46.

- 3.1 Delineamento do estudo, 46.
- 3.2 População estudada, 47.
- 3.3 Preparação do material, 47.
- 3.4 Classificação diagnóstica, 48.
- 3.5 Sistema de captura de imagens (vídeo fotômetro), 50.
- 3.6 Metodologia de extração de características de textura nuclear, 52.
- 3.7 Definição dos conjuntos de núcleos estudados, 54.
- 3.8 Programas de computador, 58.

3.9 Conceitos de assinatura nuclear, distância padronizada da população celular normal, distância média padronizada da população normal e distância média padronizada ponderada da população normal, 59.

RESULTADOS, 71.

DISCUSSÃO, 86.

CONCLUSÕES, 97.

APÊNDICE, 98.

GLOSSÁRIO, 112.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 116.

LISTA DE TABELAS

- Tabela I. Conjuntos e subconjuntos de núcleos celulares estudados, 56
- Tabela II. Conversão de escala de características de textura nuclear, 64.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Modelo esquemático de um núcleo celular típico, 3.
- Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de seção ultrafina, de cortes de hepatócitos de rato corados por acetato de uranila e chumbo e por coloração regressiva baseada em EDTA, 4.
- Figura 3. Organização espacial nuclear em hepatócitos de rato, 6.
- Figura 4. Fotomicrografia de fração nuclear, 7.
- Figura 5. Conceitos fundamentais de imagens digitais: resolução espacial e resolução espectral, 10.
- Figura 6. Exemplo de segmentação guiada por conhecimento, 29.
- Figura 7. Exemplo de uma modificação de estrutura de dependência, 36.
- Figura 8. Sequência morfológica proposta para carcinogênese na próstata humana, 49.
- Figura 9. Sistema de visão computacional do Centro de Ciências Ópticas da Universidade do Arizona, 53.
- Figura 10. Descrição da assinatura nuclear. 61.
- Figura 11. Assinaturas nucleares utilizando valores escalonados, 65.
- Figura 12. Assinaturas de núcleos após a padronização em relação a população normal, 67.
- Figura 13. Distâncias médias padronizadas ponderadas da população normal, 68.
- Figura 14. Assinaturas de padrão histológico, 70.
- Figura 15. Assinaturas nucleares de núcleos individuais da população celular normal e de lesões, 72

- Figura 16. Assinaturas nucleares de núcleos individuais da população celular normal e células de morfologia normal próximas a lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, 73.
- Figura 17. Assinaturas de padrão histológico para as categorias normal, lesões pré-neoplásicas e adenocarcinomas, 74.
- Figura 18. Assinaturas de padrão histológico compostas por glândulas de morfologia normal na proximidade de lesões pré-neoplásicas e adenocarcinomas, 75.
- Figura 19. Assinaturas de padrão histológico de próstatas normais, 76.
- Figura 20. Assinaturas de padrão histológico de próstatas com lesões pré-neoplásicas, 77.
- Figura 21. Assinaturas de padrão histológico de áreas com aparência histológica normal em casos de adenocarcinoma de próstata, 77.
- Figura 22. Distribuição da densidade óptica total dos núcleos celulares de casos normais, lesões pré-neoplásicas, adenocarcinomas e de áreas de microinvasão, 80.
- Figura 23. Assinaturas nucleares dos casos de lesões pré-neoplásicas e das áreas de microinvasão, 81.
- Figura 24. Assinaturas de padrão histológico nucleares dos casos de lesões pré-neoplásicas e das áreas de microinvasão, 82.
- Figura 25. Assinaturas nucleares de locais a distâncias diferentes de áreas de microinvasão, 84.
- Figura 26. Glândula com área de microinvasão, 85.
- Figura A1. Matriz de co-ocorrência, 101.
- Figura A2. Matriz de comprimento de sequência, 102.

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD: *charge coupled device*, componente principal das videocâmaras.

dmpn: distância média padronizada da população normal.

dpn: distância padronizada da população celular normal.

DOT: densidade óptica total.

EDTA: *Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid*. Ácido etilenodiaminotetracético.

FRO: frequência relativa de ocorrência.

NIP: neoplasia intraepitelial prostática.

NIP-BG: neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau.

NIP-AG: neoplasia intraepitelial prostática de alto grau.

RMS: *root mean squared*.

RNP: ribonucleoproteínas.

TICAS: *Taxonomic intra-cellular analytic system*.

SINOPSE

A assinatura digital é um histograma representativo de conjuntos de características de textura da cromatina do núcleo celular observado por microscopia óptica convencional. A assinatura digital é obtida através de análise de imagem computadorizada. Tal método permite o estudo do núcleo celular em material citológico e tecidos histológicos normais ou que apresentem alterações morfológicas relacionadas a processos patológicos.

O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar núcleos celulares de forma específica desenvolvendo um método de visualização de parâmetros de textura de cromatina (assinatura nuclear digital) que permitisse ainda avaliar alterações teciduais através do grau de desvio da normalidade apresentado por seus núcleos.

Foram estudadas 93 características descritivas da distribuição espacial e estatística da textura de cromatina de imagens digitais de alta resolução de 5.045 núcleos celulares provenientes de 32 espécimes de tecido prostático. A próstata foi utilizada por ser o protótipo de desenvolvimento do laboratório de imagens biomédicas do Centro de Ciências Ópticas da Universidade do Arizona, nos Estados Unidos.

Foram desenvolvidos e padronizados métodos para visualização de características de textura nuclear (assinaturas digitais) e de áreas de tecido (assinaturas de padrão histológico) e para quantificação do grau de desvio de células e áreas de tecido de interesse em relação à população normal de referência (distância padronizada da população celular normal).

Tal método, que pode ser utilizado sem restrições em qualquer material colhido e preparado por técnicas convencionais para estudo citológico ou histológico demonstrou sensibilidade para detectar alterações subvisuais na textura da cromatina de células aparentemente normais, próximas de lesões pré-neoplásicas e neoplasias malignas. Tais potencialidades podem aumentar a sensibilidade diagnóstica dos métodos de investigação baseados nesse tipo de material.

SUMMARY

The digital signature is a histogram representing a set of nuclear chromatin texture features under conventional microscopy. It is obtained by computerized image analysis procedures and allows the study of cytologic and histologic material.

The main goal of this project was to characterize nuclei in a specific manner by developing a chromatin texture signature and to characterize histologic tissue by means of their composition of nuclei with diverse degrees of deviation from normal.

A set of 93 features descriptive of the spatial and statistical distribution of nuclear chromatin was computed for each of 5,045 nuclei from 32 specimens of prostatic tissue ranging from normal appearing tissue to intraepithelial lesions and adenocarcinoma. The prostate is the organ used as prototype to develop the digital signature technology at the Arizona Optical Sciences Center, USA.

Standardized methods to visually inspect nuclear chromatin texture features (digital signatures) and tissue areas (histologic pattern signature) were developed. And a standardized distance from normal numerical profile was developed.

The digital signature can be applied without any restriction to all cytologic and histologic material sampled by biopsy, exfoliative and aspirative techniques. The digital signatures are also capable of detecting subtle changes of the chromatin pattern of normal appearing cells at the vicinity of precursor lesions and carcinomas. Such potential may have a positive impact on the sensitivity of methods based on citologic and histologic studies.

1. INTRODUÇÃO

Alterações da estrutura celular ou tecidual são elementos diagnósticos fundamentais na citopatologia e patologia cirúrgica. O componente celular de maior valor isolado para diagnóstico de processos patológicos tais como neoplasias malignas é o núcleo. Alterações em volume, forma e organização interna do núcleo tais como a disposição da cromatina e características nucleolares são fundamentais para a patologia cirúrgica e também constituem a base para interpretação de espécimes citopatológicos obtidos por esfregaço ou punção aspirativa, quando informações sobre a arquitetura tecidual não estão presentes. O presente estudo utiliza técnicas de inteligência artificial e quantificação por análise de imagem digital para avaliação de características morfológicas e densimétricas de núcleos celulares.

1.1 A matriz nuclear como base estrutural para a função do genoma

A pesquisa sobre as propriedades organizacionais, funcionais e reguladoras do genoma tem avançado rapidamente nos últimos anos, como consequência dos progressos da genética e biologia molecular(1). Apesar de todos os avanços, a compreensão da arquitetura do núcleo celular e organização do genoma ainda é muito limitada. Até muito pouco tempo os conceitos relacionados ao núcleo celular eram derivados dos estudos de microscopia óptica convencional realizados a partir do final do século XIX, responsáveis por uma concepção reducionista dessa organela. De acordo com o modelo baseado na microscopia óptica, o núcleo seria composto por três elementos: a cromatina, que na verdade corresponderia apenas à heterocromatina visualizada pelas técnicas então

disponíveis, o nucléolo e o nucleoplasma ou cariolinfa, cuja transparência levou à crença de que se tratasse de um fluido ou gel(2).

Tais conceitos começaram a ser revisados com a aplicação da microscopia eletrônica a partir do final dos anos 50. A resolução da microscopia eletrônica começou a revelar estruturas submicroscópicas de forma e densidade variadas nas regiões entre a cromatina densa. Cariolinfa começou a parecer uma denominação inapropriada e Fawcett sugeriu o termo matriz nuclear em 1966(2, 3).

A forma da célula é governada por um sistema dinâmico que conecta as redes tridimensionais da matriz extracelular, citoesqueleto e matriz nuclear. A matriz nuclear é a subestrutura que permanece após a utilização de diferentes técnicas de preparação para microscopia eletrônica que podem incluir calor, detergentes, soluções salinas e outros métodos associados à digestão por nucleases(4-6). O desenvolvimento de colorações regressivas baseadas em EDTA (*ethylene diamine tetra-acetic acid* ou ácido etilendiaminotetracético) para microscopia eletrônica, permitiu a visualização de tal subestrutura(7, 8), composta por grânulos protéicos e filamentos conectados à lâmina própria do núcleo. Tais filamentos são semelhantes em diâmetro aos filamentos intermediários do citoesqueleto. A figura 1 exhibe o modelo atual do núcleo celular com suas organelas e a figura 2 mostra fotomicrografias por microscopia eletrônica da matriz nuclear utilizando coloração convencional com EDTA.

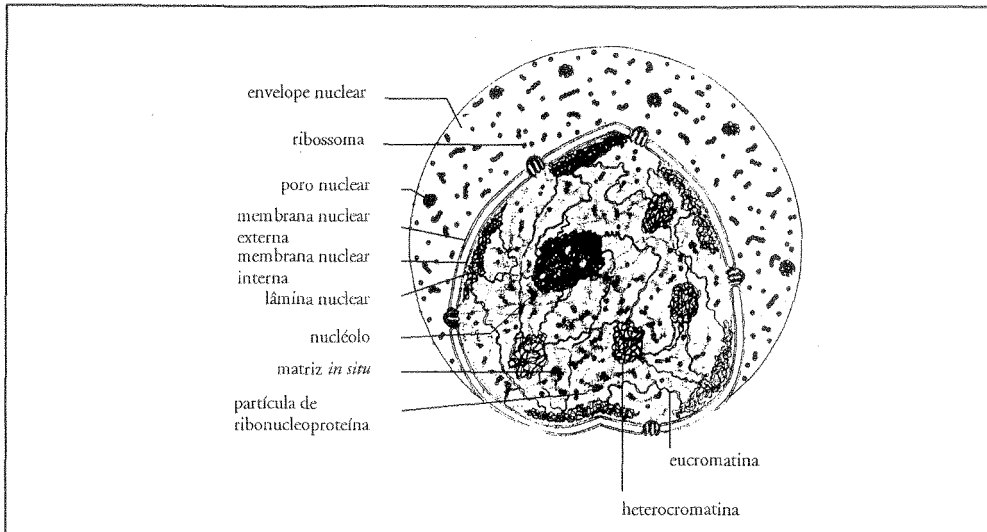


Figura 1. Modelo esquemático de um núcleo celular típico. O núcleo é envolvido por um envelope nuclear constituído por duas membranas e poros nucleares. Ribossomos são encontrados na superfície da membrana nuclear externa individualmente e arranjados em polissomos. A cromatina no interior do núcleo é interpretada como um sistema contínuo de regiões compostas por cromatina condensada (heterocromatina) e difusa (eucromatina). As regiões não-cromatínicas do núcleo contém o nucléolo, partículas de ribonucleoproteína e a matriz nuclear *in situ*, formando uma rede difusa que conecta o nucléolo e cromatina aos poros nucleares. A lâmina nuclear pode ser considerada um componente periférico da matriz nuclear, sendo conectada a porções da membrana nuclear interna(2). Modificado do desenho de L.A. Buchholtz (9).

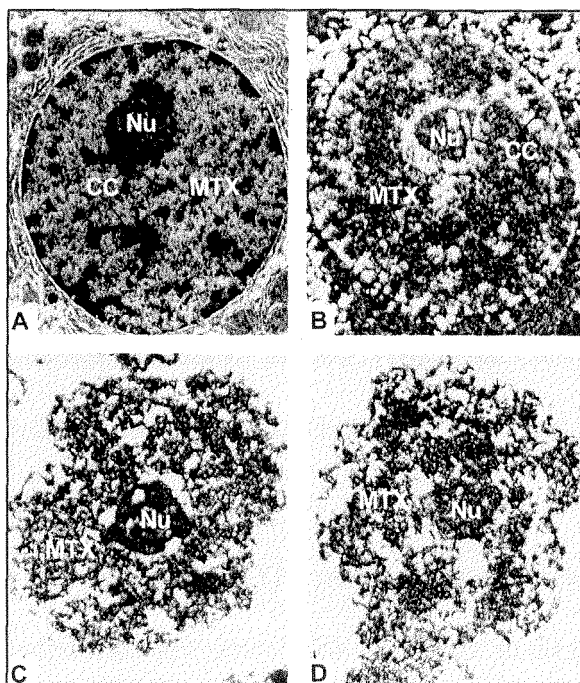


Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de seção ultrafina, comparando cortes de hepatócitos de rato corados por acetato de uranila e chumbo e por coloração regressiva baseada em EDTA, que cora palidamente a cromatina mas mantém o contraste de outras estruturas, especialmente as que contém ribonucleoproteínas. Podem ser visualizados o nucléolo (Nu), a cromatina condensada ou heterocromatina (CC) e a região da matriz nuclear (MTX). É notável a similaridade na estrutura da matriz isolada e *in situ*, que demonstra o elevado nível de organização tridimensional do núcleo celular. **2A.** Hepatócito com coloração padrão. **2B.** Hepatócito corado por EDTA. **2C.** Matriz nuclear isolada corada por coloração padrão. **2D.** Matriz nuclear isolada e corada por EDTA. Modificado de Berezney et al. (2). 22.000 X.

O núcleo celular típico exibe cromatina densa distribuída pelo seu interior, estendendo-se até a periferia nuclear e também envolvendo o nucléolo. Entre as áreas de cromatina densa existem as chamadas regiões intercromatínicas, que contêm a eucromatina e a matriz nuclear, o que sugere uma associação potencial entre a replicação e transcrição da cromatina e os componentes da matriz nuclear (10). Um crescente número de estudos demonstra que o metabolismo dos ácidos nucléicos está distribuído em locais específicos do núcleo, os domínios estruturais (11-13), com seus processos catalíticos individuais e os elementos bioquímicos que os suportam (1), como pode ser visto nas figuras 3 e 4. Pelo menos dois domínios estruturais são postulados na matriz nuclear *in situ*: os domínios de cromatina e os de ribonucleoproteínas (RNP). Os domínios de cromatina correspondem aos pontos de ancoragem das duplas hélices de DNA, sendo relacionados à replicação e transcrição do DNA (11, 14) e os domínios de ribonucleoproteínas, relacionados ao processamento e transporte de RNA. O RNA recém-transcrito, após a sua liberação migra através da região intercromatínica como partículas ou fibrilas de ribonucleoproteína rumo à periferia nuclear (15-17), o que sugere a atuação da matriz nuclear como um sistema de coordenação de transcrição, processamento e transporte rumo aos poros nucleares.

A matriz nuclear é o único elemento nuclear com composição química diretamente relacionada ao fenótipo da célula. A composição protéica da matriz nuclear depende do estado de diferenciação celular e varia entre diferentes tipos celulares (18-20), bem como ao longo dos estágios de desenvolvimento celular na vida fetal (21). Essa característica fornece evidências de que a matriz nuclear participa da regulação e coordenação da expressão do fenótipo celular (1, 11) já que o padrão de expressão fenotípica parece ser determinado principalmente durante a transcrição do DNA, embora alguns outros mecanismos alternativos tenham sido descritos (22, 23).

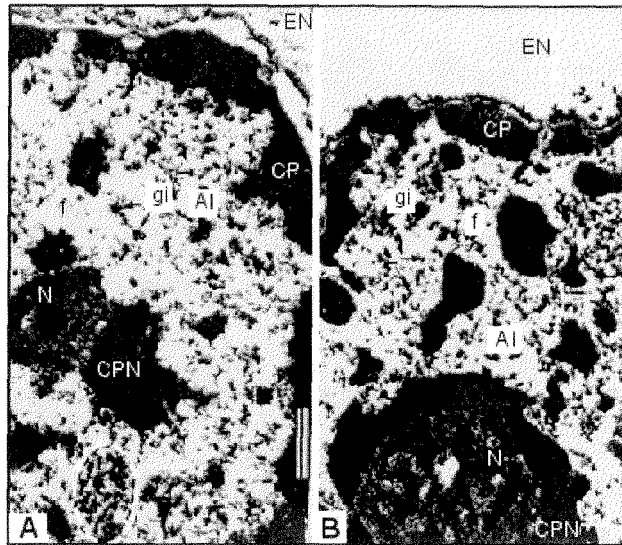


Figura 3. Organização espacial nuclear em hepatócitos de rato. A figura 3A exibe um núcleo *in situ* no tecido hepático, onde se pode observar o envelope nuclear (EN), nucléolo (N), cromatina perinucleolar condensada (CPN), cromatina periférica condensada (CP) e áreas intercromatínicas (AI). A figura 3B mostra uma fração nuclear isolada do mesmo material. A fração nuclear mantém a arquitetura observada no núcleo *in situ*. As áreas intercromatínicas contém partículas elétron-densas denominadas de grânulos intercromatínicos (gi) e material fibroso menos denso (f). A linha descontínua na figura 3A delimita um agrupamento de grânulos intercromatínicos. Modificado de Berezney e Coffey (24). 40.000 X.

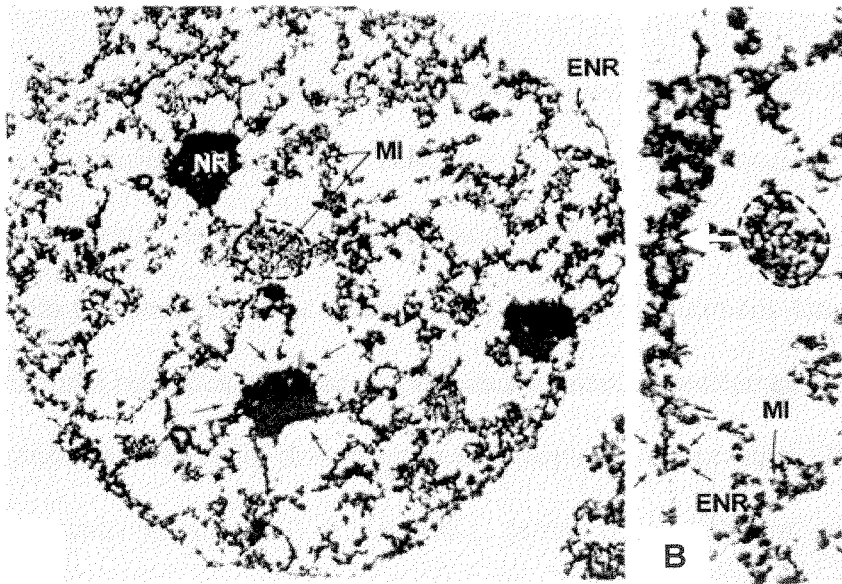


Figura 4. A figura 4A é uma fotomicrografia eletrônica de fração nuclear mostrando componentes da estrutura interna da matriz nuclear, como o nucléolo residual (NR), a estrutura interna da matriz (MI) e o envelope nuclear residual (ENR). Os espaços vazios em torno do NR e aqueles indicados por flechas provavelmente foram ocupados por cromatina perinucleolar e periférica respectivamente. 21.000 X. A figura 4B mostra o componente protéico da matriz nuclear em maior aumento, em uma região do envelope nuclear residual (ENR). A flecha branca mostra a estreita relação entre a estrutura interna da matriz nuclear e ENR. As quatro flechas escuras apontam os vestígios de um poro nuclear da ENR. Algumas regiões da estrutura da matriz (linha descontínua) são semelhantes a agrupamentos de grânulos intercromatínicos como os observados na figura 3. Modificado de Berezney e Coffey (24). 50.000 X.

1.2 A matriz nuclear nas neoplasias malignas

As alterações progressivas do tamanho, forma e organização nucleares que acompanham a malignidade envolvem modificações na matriz nuclear(25-28). Tais modificações estruturais, embora de significado diagnóstico fundamental, não são compreendidas em profundidade. Nos últimos anos, estudos bioquímicos tem relatado que determinados tumores humanos apresentam proteínas da matriz nuclear ausentes no tecido normal correspondente. Isso já foi demonstrado em neoplasias de próstata (29, 30), mama (31), cólon (32), colo uterino (33) e rim (33), dentre outras. Porém, ainda não foi identificado um único polipeptídeo na matriz nuclear de células neoplásicas que não esteja presente no tecido normal correspondente. E as restrições relacionadas à metodologia da maior parte dos trabalhos publicados fazem necessários estudos bioquímicos mais amplos e detalhados para que se possa estabelecer se tais polipeptídeos são sintetizados apenas por células malignas ou são produtos de modificações pós-tradução de polipeptídeos também presentes no tecido normal (2). E a hipótese de que as alterações descritas na literatura correspondam a um processo de regressão da matriz nuclear a estágios intermediários de diferenciação celular também deve ser considerada.

Foi a análise de imagem computadorizada que permitiu avanços no estudo da matriz nuclear através da análise multidimensional dos domínios estruturais e, em conjunto com a biologia molecular, está inaugurando uma nova área de investigação: a morfologia molecular do genoma (2). Porém, encontrando justificativa teórica na organização nuclear a nível ultraestrutural e mais próximos dos procedimentos rotineiros dos laboratórios de patologia cirúrgica e citopatologia estão os métodos de quantificação por análise de imagem baseados

em microscopia óptica convencional e aplicados a espécimes preparados e corados por técnicas básicas, como os utilizados neste trabalho.

1.3 Quantificação em patologia

A integração da patologia com a tecnologia digital e a teoria da informação (34) também descortina novos horizontes, utilizando técnicas de videomicroscopia digital e processamento de dados aplicadas a dados clínicos e imagens microscópicas. A quantificação em patologia é a base para a integração dessas áreas, adicionando informações sobre tamanho e forma do núcleo, distribuição da cromatina, relação de área entre núcleo e citoplasma, intensidade e padrão de distribuição de colorações, arquitetura de glândulas e centenas de outras características celulares e teciduais cuja mensuração é possível somente através da análise de imagem digital. A figura 5 apresenta alguns conceitos fundamentais para compreensão de imagens digitais.

Os objetivos principais da quantificação em patologia, seja histopatologia ou citopatologia são: acrescentar objetividade na avaliação de casos e utilizar métodos capazes de aumentar as capacidades diagnóstica, prognóstica e, possivelmente, terapêutica(35). Mensurar é um procedimento científico básico e é tão antigo em microscopia que sua primeira utilização remonta à invenção do microscópio. Antoni van Leeuwenhoek determinou o tamanho dos eritrócitos humanos em 1674 (36).

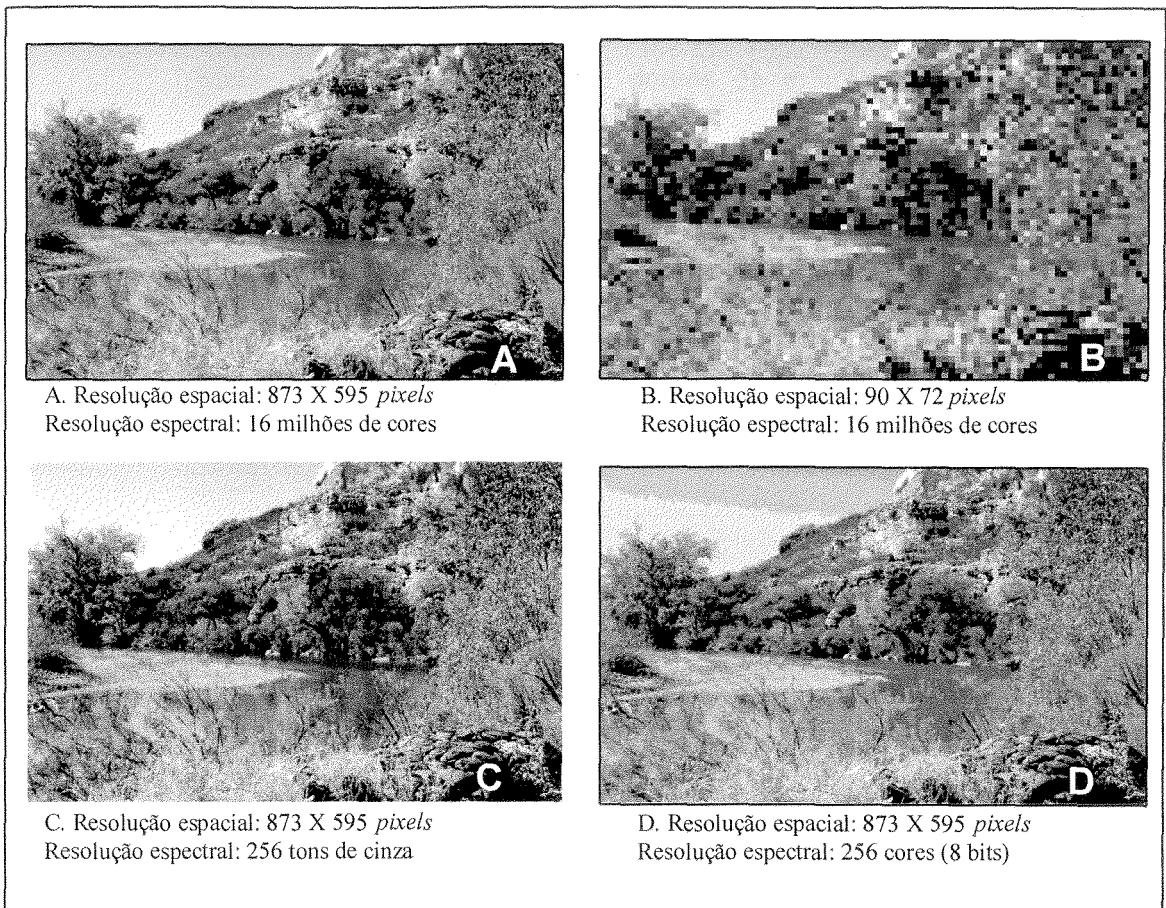


Figura 5. Dois conceitos são fundamentais para compreensão de imagens digitais: resolução espacial e resolução espectral. A resolução espacial define o número de elementos de imagem (*pixels*) que compõem a imagem. Quanto mais elementos de imagem por área, maior a resolução espacial. As figuras **5A**, **5C** e **5D** tem, originalmente, resoluções espaciais de 873 *pixels* horizontais por 595 *pixels* verticais. A imagem **5B** possui 90 X 72 *pixels*. Cada quadrado com a mesma cor representa um elemento de imagem. A resolução espectral diz respeito ao número de tonalidades ou cores exibidas pela imagem. O número de bits que define o espectro de cores ou tonalidades de cada elemento de imagem determina o número total de cores possíveis. Uma imagem com 256 tons de cinza ou 256 cores tem uma resolução espectral de 8 bits por elemento de imagem (utilizando-se código binário, onde cada bit só pode ter valores iguais a zero ou um, existem 256 combinações possíveis utilizando-se 8 bits, pois $2^8 = 256$). As imagens **5A** e **5B** tem resoluções espectrais de 24 bits, ou 16 milhões de cores ($2^{24} = 16.777.216$). As imagens **5C** e **5D** possuem 256 tons de cinza e 256 cores, respectivamente. Foto original: Montezuma National Monument, Arizona, EUA.

Mensurações permitem definir pontos de referência, medidas descritivas básicas de valor e variações que servem também na avaliação da reprodutibilidade dos procedimentos. Os primeiros empreendimentos em larga escala empregando a quantificação em patologia são relativamente recentes. Reagan (37) realizou um extenso estudo pioneiro de mensuração de células benignas e malignas da ectocérvice em 1952, determinando os primeiros parâmetros para estudos de patologia quantitativa cérvico-vaginal.

Principalmente nos anos 90, trabalhos tem evidenciado a possibilidade de diferenciar de forma inequívoca um núcleo celular em tecido normal de um núcleo de aparência normal mas proveniente de tecido com lesões pré-malignas ou malignas (38-43) através do uso de parâmetros cariométricos. A detecção de tais alterações em células de aparência normal baseia-se em características morfológicas sutis além da capacidade de percepção visual humana (39, 44, 45). Foi a descoberta dos achados subvisuais que ofereceu a possibilidade de modificar estratégias de rastreamento de alterações morfológicas por análise de imagem, deslocando a busca de eventos raros como células displásicas e neoplásicas, o que poderia tornar a taxa de falsos negativos inaceitável, para testes estatísticos baseados em características de elementos presentes em número significativo, como por exemplo as células intermediárias nos espécimes citopatológicos ecto-cervicais. Subseqüentemente, alterações sutis no padrão de cromatina nuclear foram encontradas também em lesões colônicas (46), tireoidianas (44) e prostáticas (40, 42). Na cérvice uterina essas alterações foram encontradas na proximidade das lesões, a distâncias inferiores a um milímetro. Já na tireóide, tais alterações foram encontradas no tecido aparentemente normal a distâncias variáveis da lesão. No cólon foram demonstradas alterações detectáveis a até cinco centímetros da lesão.

Poucos trabalhos foram realizados em patologia pulmonar utilizando técnicas de quantificação. A maior parte desses estudos foram de demonstração metodológica, utilizando pequenas amostras e avaliando poucas características nucleares, tais como densidade óptica(47), área nuclear(48), tamanho e forma de nucléolos(49), dentre outras. Ao longo da década de 80 surgiram os primeiros esforços para a detecção de marcadores precoces de malignidade em amostras de escarro(50). Mas foi o aumento na capacidade de processamento de dados e o desenvolvimento simultâneo da imagética digital que permitiram o surgimento de métodos de análise de imagem para pneumologia baseados na avaliação de múltiplas características nucleares(51-53).

Estudos quantitativos permitem detectar e documentar a significância de diferenças de tais alterações mínimas a nível celular e tecidual. Processos patológicos incipientes, efeitos de exposição a agentes químicos, físicos ou qualquer outra situação que provoque sutis variações da normalidade podem ter a sensibilidade de detecção aumentada através dessas técnicas (54). A metodologia de mensuração também pode ser aplicada a rigorosos testes de hipótese, permitindo a detecção desses achados subvisuais. O desenho adequado de experimentos pode detectar também alterações mascaradas por elementos como a variabilidade de um paciente para outro (55, 56).

1.4 Conceitos e História da Micromorfometria, Estereologia e Microfotometria

A morfometria e fotometria quando aplicadas à microscopia ganham o prefixo micro, embora seus conceitos não sofram qualquer modificação. Essas duas técnicas fornecem a base para a quantificação em Biologia. A seguir esses e outros conceitos relacionados serão apresentados.

Morfometria: pode ser definida como a mensuração de estruturas por qualquer método (57). A morfometria inclui portanto procedimentos planimétricos e estereológicos e esse será o conceito utilizado nesse trabalho. Alguns autores limitam a morfometria em patologia a procedimentos planimétricos, excluindo a estereologia (58).

Planimetria: é o termo utilizado para mensurações geométricas limitadas a duas dimensões.

Estereologia é o conjunto de técnicas usadas para obtenção de informações quantitativas sobre características geométricas com sistemas de testes de dimensão menor que o objeto ou estrutura estudados. Por exemplo, um método baseado em contagens sobre grade bidimensional pode ser utilizado para avaliação de volume de estruturas tridimensionais como vilosidades intestinais. Nesse conceito a estereologia engloba também técnicas de extrapolação de dados a partir de uma ou duas dimensões (59-61).

Citometria: é a mensuração de características citoquímicas, histoquímicas ou moleculares de células e tecidos, sendo baseada principalmente no estudo da densidade óptica de estruturas.

Cariometria: é a mensuração de características do núcleo celular.

Morfometria

Áreas, superfícies e formas são variáveis estudadas pela morfometria. Esse termo foi criado inicialmente para os procedimentos de mensuração de distâncias entre pontos em mapas geográficos, o que demonstra o caráter multidisciplinar da morfometria desde sua origem (57). Esse método tem sido aplicado principalmente a cortes histológicos para graduação e avaliação prognóstica de neoplasias, sendo empregado em estudos de patologia mamária, ovariana e neoplasias vesicais, dentre outras (62-66). A morfometria dos tecidos foi utilizada inicialmente para a compreensão da morfologia tridimensional e fisiologia teciduais (35). Em seus primórdios, 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. Tais desenhos eram transferidos para moldes de metal que eram posteriormente recortados e medidos, com isso obtendo-se estimativas de volume e massa. As reconstruções tridimensionais eram finalmente realizadas em modelos de madeira (59). Toda essa metodologia, além de lenta e cara era muito tediosa, sendo substituída gradualmente pelos métodos estereológicos. Hoje, as avaliações tridimensionais de preparados histológicos derivam quase exclusivamente da

estereologia e a planimetria é utilizada em avaliações de áreas e objetos com duas dimensões.

Estereologia

A estereologia foi utilizada nos trabalhos de Nicolau Copérnico (1473-1543) e Johannes Kepler (1571-1630), que forneceram os exemplos mais engenhosos e originais do uso dessa técnica (59). No século seguinte Georges Louis Leclerc, Conde de Buffon (67), lançou o seguinte desafio à Academia Francesa: qual seria a probabilidade de uma agulha de tamanho definido interceptar uma das linhas paralelas desenhadas sobre uma folha de papel a intervalos constantes, ao ser lançada de forma aleatória? A solução apresentada pelo próprio Leclerc em 1777 lançou as bases de um ramo da ciência chamado probabilidade geométrica, que contém a estereologia.

Os primeiros relatos de uso da estereologia em microscopia envolveram o estudo da estrutura interna de metais, quando o médico alemão C. von Schreibers examinou a superfície de um meteorito (68). O geologista francês Delesse (69) foi o primeiro pesquisador a realizar análise microscópica quantitativa, provando que, em seções transversais de agregados minerais uniformes, a área ocupada por cada elemento constituinte é exatamente proporcional à sua fração de volume correspondente no mineral. Em 1943 o fisiologista Chalkley (70) avançou o potencial da metodologia para aplicações nas ciências biológicas, permitindo a observação simultânea e contagem de múltiplos objetos de interesse, tais como células e vasos sanguíneos. Essa técnica é usada hoje com a

inserção de graticulas nas oculares do microscópio ou adição de grades em imagens digitais. O método estereológico também elevou a velocidade da mensuração a níveis aceitáveis.

A estereologia é especialmente adequada para estudos de microscopia devido a dois aspectos: cortes histológicos reduzem a espessura do tecido a alguns micrômetros, tornando-o translúcido, o que permite a visualização de detalhes morfológicos através da microscopia óptica convencional, baseada na transiluminação do tecido estudado. Além disso, os sistemas ópticos empregados na microscopia possuem uma característica denominada profundidade focal, que define a extensão do plano de foco do instrumento. Em princípio, quanto maior a magnificação das lentes utilizadas, mais restrito será esse plano. Essas propriedades dos preparados histológicos e dos instrumentos ópticos fazem com que o observador examine apenas dois planos do tecido: altura e largura. Com essa redução dimensional, volumes tridimensionais tornam-se áreas bidimensionais, e, dependendo da direção do corte, superfícies bidimensionais podem tornar-se linhas unidimensionais e linhas podem ser visualizadas como pontos. A estereologia torna possível estimar volumes a partir de frações de área e áreas de superfície a partir do comprimentos de linhas de forma eficiente, acurada e rápida (57, 60, 61).

Microfotometria

A microfotometria se desenvolveu de maneira menos ordenada do que a morfometria e suas aplicações na microscopia. A luz que passa através de um espécime histológico ou citológico é absorvida de forma seletiva por um corante (ou cromóforo) em um comprimento de onda luminosa correspondente à cor complementar desse corante. Por

exemplo, a cor da chamada reação de Feulgen (71) é vermelha e o comprimento de onda complementar utilizado para o estudo dessa coloração é o verde (560 nm). A reação de Feulgen é específica e estequiométrica para o DNA, ou seja: há relação direta entre a quantidade de corante e o conteúdo de DNA. A quantidade de corante determina o quanto da luz será absorvido (absorbância) ou transmitido através do espécime. Quanto mais corante presente, maior a absorbância. Em 1854, Beer demonstrou a relação entre a densidade óptica e a concentração da substância capaz de absorver luz em determinado comprimento de onda, o que deu origem à Lei de Beer, onde:

$$A = -\log (I_t / I_0)$$

Sendo A o valor de absorbância, I_t a intensidade da luz transmitida e I_0 a intensidade da luz incidente. Lambert determinou a relação entre a densidade óptica de um objeto e a espessura da camada dotada de propriedades absorptivas em 1860. As observações de Beer e Lambert deram origem à chamada lei de Lambert-Beer, expressa como:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot L$$

Onde A é o valor de absorbância, ϵ é a constante que expressa o coeficiente de densidade óptica por mili-mol do corante utilizado, C é a concentração de corante expressa em mili-mols por centímetro cúbico e L é a espessura do corte expressa em centímetros(72). Baseada nessas equações a extinção, termo hoje substituído por densidade óptica, foi definida e relacionada à concentração e espessura do material absorvente por Bunsen e Roscoe em 1862 (73). As descobertas desses pesquisadores encontraram

utilização em várias áreas que utilizam procedimentos de densimetria, tais como a radiologia, e tornaram-se elementos centrais na citoquímica quantitativa a partir de 1950.

A primeira utilização bem documentada da microfotometria foi no estudo das características espectroscópicas de pigmentos naturais em células e tecidos, como a hemoglobina (74). Ernst Abbe, da empresa Carl Zeiss (Jena, Alemanha), construiu uma “ocular microespectral” (75). Tal sistema permitiu a observação de organelas que vieram a ser conhecidas como citocromos em 1886.

As lentes objetivas capazes de operar nas faixas do ultravioleta (76) trouxeram avanços decisivos para a microfotometria. Tais objetivas não foram desenhadas com esse propósito, mas para aumentar a resolução espacial do microscópio óptico convencional, aproveitando o comprimento de onda curto na faixa do ultravioleta. Foi A. Köhler, o mesmo criador do revolucionário sistema de iluminação do microscópio moderno que, ao fotografar a epiderme de salamandras em luz ultravioleta, comentou sobre a forte absorção de luz nessa faixa de onda pela cromatina nuclear (77). Em 1911, Vles (78) usou a mesma técnica para demonstrar a absorção de ultravioleta pelas proteínas e núcleos celulares do tecido muscular. Em 1934 Lucas, um cientista da área da metalurgia, explorou a técnica no estudo de células tumorais (79). Ele concebeu também a idéia de realizar a avaliação da cromatina através de um microfotômetro (80). Provavelmente esse foi o primeiro pesquisador a utilizar a microfotometria em material citológico.

Em 1932, T. Caspersson (81-83) criou as bases para a microfotometria quantitativa estudando as propriedades absorptivas dos colóides e géis como modelos de constituintes celulares. Esses trabalhos permitiram aplicar técnicas de fotometria a pequenas regiões de imagens celulares. Em sua tese de doutorado, Caspersson demonstrou as

propriedades de densidade óptica dos ácidos nucléicos do núcleo celular (84). Ele igualmente foi o primeiro pesquisador a oferecer estimativas do conteúdo nuclear de ácidos nucléicos (85). Naquele período não havia compreensão sobre o verdadeiro papel do DNA, que era considerado um subproduto da síntese protéica. Acreditava-se que a informação genética era carregada pelas moléculas protéicas, embora Caspersson tenha relacionado o aumento do conteúdo celular de ácidos nucléicos com a etapa de divisão celular (86). Apesar das dificuldades e custos da técnica de microfotometria naquela época, o trabalho de Caspersson causou profunda impressão. Mais estudos, já baseados na faixa visível do espectro luminoso começaram a surgir. Em 1933, Mainland (87) estimou o conteúdo nuclear de hematoxilina em células normais e neoplásicas da ectocérvice. Esse estudo também demonstrou que o conteúdo de cromatina em núcleos de células normais é constante. Os estudos de Caspersson e Mainland, baseados respectivamente na absorção de ultravioleta e hematoxilina em preparados citoquímicos, não podiam distinguir o DNA do RNA. Foi o desenvolvimento da reação de Feulgen (71), específica para o DNA, que estabeleceu as bases para a microfotometria específica do DNA utilizando a faixa visível do espectro luminoso.

Os instrumentos para mensuração de corrente elétrica começaram a apresentar custos razoáveis no final da década de 40. Isso permitiu a Pollister (88) criar o primeiro microfotômetro em 1948: um microscópio óptico convencional com abertura ocular adequada para mensurações em áreas definidas, acoplado a um fotômetro e um galvanômetro para leitura da corrente elétrica gerada. Ris (89) foi possivelmente o primeiro pesquisador a estimar o conteúdo total de DNA celular baseado na reação de Feulgen, também em 1948. Em 1950 Swift (90) demonstrou claramente a duplicação do conteúdo de

DNA celular antes da mitose. Tal publicação desencadeou uma série de trabalhos buscando apurar ainda mais a técnica da microfotometria.

Na fotometria convencional presume-se que o material absorvente seja distribuído de forma homogênea. No núcleo celular, a absorção não é sequer remotamente homogênea, o que traz limitações às mensurações baseadas em tal método(91). A estimativa do conteúdo total de reagente não pode ser simplesmente o resultado da soma de todas as subáreas do núcleo celular. É necessário realizar o somatório dos logaritmos negativos da transmitância, que vem a ser a densidade óptica. A ausência de homogeneidade do material absorvente foi controlada através de diferentes abordagens, como o uso de dois comprimentos de onda diferentes (92, 93), dentre outros métodos, o que permitiu procedimentos de maior precisão. Nesse período, foram descobertas diferenças microfotométricas relacionadas à compactação de cromatina (94). Da mesma forma a aneuploidia em células tumorais foi documentada. Tais desenvolvimentos foram muito significativos, pois permitiram o estudo sistemático de material clínico. E os estudos de Richards e Atkin (95) em 1959 iniciaram uma era de extensos estudos citoquímicos em oncologia, especialmente do carcinoma de colo uterino.

Até 1966 os microfotômetros geravam apenas sinais analógicos. A capacidade de converter sinais analógicos para o formato digital tornou possível a representação de imagens ópticas como matrizes de valores de densidade óptica, o que trouxe a mudança fundamental na área: o começo da videomicroscopia e da análise de imagem digitais.

1.5 Análise de imagem digital

A análise de imagem digital consiste no uso de computadores para derivar informação numérica relacionada a características da imagem selecionada, tais como perímetros, áreas, densidades ópticas e outras (96). O processo de análise de imagem pode ser dividido em vários estágios:

- aquisição e transcrição da imagem para o formato digital;
- processamento (ou condicionamento) da imagem;
- segmentação;
- extração de características morfométricas e fotométricas;
- análise de características;
- classificação.

Aquisição e transcrição da imagem para o formato digital

A aquisição de imagens inclui vários métodos, que utilizam videocâmaras ou CCDs (*Charge Coupled Devices*), aquisição de imagens a partir de fotografias, lâminas de microscopia e outros meios como *scanners* (rastreadores), espectrofotômetros e outros equipamentos que produzam informação visual. A imagem adquirida é então convertida através de um circuito eletrônico denominado conversor A/D ou analógico/digital. Os conversores A/D são dispositivos que convertem informações muitas vezes contínuas no espaço em unidades elementares, como o elemento de imagem ou *pixel*, no caso de imagens, representado na figura 5. Os conversores A/D são capazes de converter informações de várias origens para o formato digital, como sons nos CD (*Compact Discs*) musicais, vozes nos sistemas de telefonia contemporâneos e diferentes dados vitais nos sistemas de monitorização de pacientes baseados em tecnologia digital.

Processamento de imagem

Uma imagem digital pode necessitar de processamento, que pode corrigir ou minimizar problemas relacionados à iluminação e óptica do microscópio. Esta etapa permite a extração de informação com ou sem redução de dados. A literatura dedicada a procedimentos de processamento de imagem é ampla (97-99) e inclui:

correção de imagem: permite reduzir ou eliminar defeitos de iluminação da imagem que possam ter sido originados por imperfeições no dispositivo detector

(videocâmara), iluminação inadequada por efeito de descentralização, baixa intensidade ou desuniformidade.

Melhoria de imagem (*image enhancement and filtering*): inclui manipulação de contraste, equalização de histograma de cores ou tonalidades, diversos filtros, análise fractal, adição, subtração e multiplicação de imagens.

Segmentação

Diferentes métodos podem ser utilizados para segmentar uma imagem, ou seja: delinear precisamente o objeto ou conjunto de objetos que será medido. A segmentação pode ser feita de três maneiras:

- a. manualmente pelo observador, o que pode ser extremamente lento e tedioso;
- b. pode ser feita de forma interativa, ou seja, permitindo que o computador faça a seleção preliminar dos objetos com base em critérios como forma ou tonalidade e permitindo a seleção e correções finais pelo observador;
- c. de forma inteiramente automática pelo computador, através de critérios morfológicos ou através de métodos de automação de inteligência, que permitem à máquina incorporar e utilizar os critérios de seleção de um observador e podem ainda oferecer ao sistema a capacidade de aprendizado para desenvolver novas soluções de segmentação. Dois métodos tem sido

mais utilizados para atingir esses objetivos: os sistemas especialistas e as redes neurais.

A segmentação baseada em detecção de limiares (*thresholding*) consiste na divisão da imagem em regiões que correspondam a unidades estruturais identificáveis ou objetos de interesse baseada em tonalidades, descartando o restante da imagem. Essa operação é muitas vezes utilizada nos procedimentos de segmentação interativa e automatizada.

Extração de características morfométricas e microfotométricas

Essa etapa é realizada nas regiões selecionadas pela segmentação, onde programas de computador podem extrair informações sobre várias características geométricas, tais como áreas e perímetros, e relacionadas à textura da cromatina (vide Apêndice). Tais programas começam a ficar mais comuns e alguns podem ser encontrados em versões gratuitas na Internet (100) Tais versões usualmente extraem apenas características morfométricas.

Análise de características e classificação

Os programas de análise de imagem atuais geram planilhas numéricas em formatos compatíveis com a maior parte dos programas comerciais, tais como Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA), Quattro Pro (Corel Corp., Ottawa, Canadá) e Lotus 1-2-3 (Lotus Development Corp., Cambridge, MA, EUA). Alguns dos programas de análise de imagem possuem funções estatísticas básicas implementadas, mas usualmente são necessários outros programas estatísticos mais completos, como o SPSS (SPSS, Chicago, IL, EUA) e Statmost (Datamost, Salt Lake City, UT, EUA). Os procedimentos de classificação são normalmente baseados em testes estatísticos não-paramétricos (101, 102).

A representação de imagens em forma numérica apresenta mais informações além da estimativa de produtos de reações citoquímicas. Valores de densidade óptica em diferentes áreas de um núcleo celular fornecem informações estatísticas descritivas, como a densidade óptica total do núcleo, desvio padrão dos valores de densidade óptica ou a frequência relativa de valores de densidade óptica em diferentes faixas. Essas características não são percebidas pela visão humana, que não é sensível a variações sutis de densidade óptica. Além de estatística descritiva, as imagens digitais oferecem informações que podem ser consideravelmente específicas na caracterização de um núcleo celular.

A análise de imagem digital deslocou o foco de pesquisa da citoquímica quantitativa para a extração de informação diagnóstica de forma quase acidental. As questões que envolvem o uso da morfometria e fotometria estão relacionadas a dimensões físicas, composição química, citoquímica e histoquímica. Mas a análise de imagem digital

pode incluir também estruturas de dependência, identificação, informação diagnóstica e prognóstica. As décadas que sucederam ao surgimento da análise de imagem digital tem sido marcadas por esforços no desenvolvimento de suporte para a nova metodologia. Características morfométricas relacionadas à textura da cromatina e arquitetura tecidual foram definidas. E novos procedimentos para seleção de achados capazes de proporcionar informação discriminante estão sendo desenvolvidos (103-105). Um grande número de procedimentos de classificação, algoritmos de aprendizado supervisionado e não-supervisionado foram adaptados para uso em análise de imagem (106-110). A informação disponibilizada pela imagética digital somente poderia ser melhor explorada através desses procedimentos e da análise multivariada. Ao final da década de 80, representações multidimensionais de características morfométricas e fotométricas tornaram-se comuns. Condições para a utilização de representações multidimensionais de dados foram definidas e procedimentos foram desenvolvidos para estabelecer a reprodutibilidade de resultados(35).

Interpretação de imagem

A descrição das etapas da análise de imagem na maior parte da literatura não resalta um dos grandes problemas envolvidos no processo: a correta identificação de objetos em estudo. Procedimentos baseados em tonalidades e áreas muitas vezes não são suficientes para diferenciar uma célula neoplásica de um linfócito maduro. Esse problema é multidisciplinar e outros exemplos podem ser utilizados. Automóveis e aviões já conseguem realizar procedimentos de navegação e aterrissagem totalmente automatizados através de sistemas de visão computacional e inteligência artificial em virtualmente qualquer situação, incluindo respostas autônomas a imprevistos e capacidade de aprendizado(111). É

importante observar que tais problemas são bastante simples quando comparados ao reconhecimento e classificação de objetos como células.

A identificação de imagem em patologia consiste no reconhecimento das estruturas histológicas de interesse. Essa interpretação é necessária em situações em que as áreas representadas tem arquitetura complexa, como a maioria dos preparados histológicos. Essa tarefa pode ser realizada com relativa facilidade por um observador treinado, mas torna-se exaustiva ou mesmo impraticável quando é necessária a interpretação de milhares de imagens. Quando a imagem é, do ponto de vista computacional, relativamente simples, como no caso de preparados citológicos em monocamada, onde as células são prontamente individualizadas, algoritmos para segmentação de imagem são suficientes. Em tais situações, o número de componentes básicos a serem identificados é limitado ao fundo da imagem, citoplasma e núcleo. Por esse motivo, a maior parte dos estudos analíticos iniciais envolveram células isoladas. Em contraste, a segmentação de imagens a partir de cortes teciduais apresenta enormes dificuldades. E a maior parte das pesquisas realizadas em cortes histológicos tem as informações extraídas apenas dos núcleos celulares. Foi o advento de programas de segmentação de imagem interativa e automatizada que tornou a mensuração de características teciduais viável.

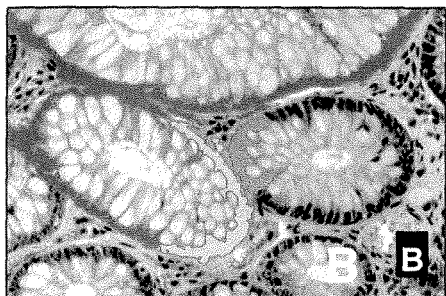
Quando estruturas histológicas complexas são estudadas, a utilização de informações prévias torna-se essencial. Tal informação tem origem em outras fontes, tais como bancos de imagens e soluções previamente utilizadas e não na imagem que está sendo estudada. A segmentação de imagem pode ser guiada por sistemas especialistas (112). Sistemas especialistas são programas de computador desenhados para substituir ou reproduzir os métodos de raciocínio de um especialista humano(113). A figura 6 mostra um

exemplo de identificação de glândulas colônicas através de sistema especialista, onde o computador compara cada produto de segmentação com um banco de imagens contendo milhares de modelos histológicos corretamente segmentados. Dependendo da complexidade e resolução da imagem estudada, vários métodos de segmentação podem ser aplicados pelo programa de computador. O sistema de visão computacional utilizado na construção do exemplo da figura 6 foi desenvolvido no Centro de Ciências Ópticas da Universidade do Arizona em Tucson(114). Esse sistema já é capaz de decidir de forma autônoma quais os procedimentos mais adequados para determinada imagem.

A identificação automática de imagens é uma etapa necessária antes que dados citométricos e histométricos como distribuição e tamanho de glândulas possam ser extraídos. Os sistemas que possuem esse nível de processamento automático são também conhecidos como sistemas de compreensão de imagem. O primeiro sistema para identificação automática de células a partir de imagens digitais foi desenhado em 1961 para detecção de linfócitos binucleados (115). Este foi também o primeiro sistema a utilizar um processador numérico para realizar operações de morfologia matemática (116).



A. Durante o primeiro procedimento de segmentação é definido um produto intermediário (em azul), definido como paredes glandulares compartilhadas.



B. Após o segundo procedimento de segmentação, são obtidos três objetos. Em verde e amarelo estão dois segmentos individuais de glândulas. Em azul pode-se observar o novo segmento glandular compartilhado



C. O terceiro procedimento de segmentação determina os limites para os novos segmentos individuais de glândulas, em azul e laranja.

Figura 6. Exemplo de segmentação guiada por conhecimento, método que pode ser aplicado a diferentes tecidos como, nesse exemplo, uma biópsia de cólon. Todo o procedimento é realizado pelo sistema especialista sem intervenção do observador, que ao final do procedimento poderá aceitar ou descartar os produtos e retroalimentar o sistema para aprimorar futuras operações. Hematoxilina e eosina, X 20. Imagem em 256 tonalidades de cinza. Segmentação em 256 cores. Modificado de Hamilton et al. (117)

Nesse mesmo período, outra máquina pioneira, o rastreador analógico do projeto Cytoanalyser da Universidade da Pennsylvania, foi convertido para o sistema digital (118), produzindo imagens de alta resolução de leucócitos. Nas primeiras publicações desse grupo foi demonstrada a possibilidade de que os sistemas digitais poderiam levar ao desenvolvimento de sistemas com capacidades de reconhecimento potencialmente superiores à humana (119, 120).

Em 1968, o projeto TICAS (*Taxonomic intra-cellular analytic system*) (121) da Universidade de Chicago estabeleceu os primeiros passos para viabilizar tal sistema. Imagens de culturas de tecido pulmonar embrionário e carcinomas epidermóides humanos sem o uso de colorações foram capturadas por um microscópio Zeiss UMSP1. Os resultados mostraram uma taxa elevada de caracterização correta do material baseada nos padrões de distribuição espacial da cromatina. Estudos adicionais passaram a recomendar o uso de imagens digitais para estudos objetivos da cromatina (122) e demonstraram diferenças pronunciadas entre células de tipos histológicos diferentes.

A quantificação e a capacidade de comparar e avaliar estruturas de dados trouxe novos desafios, como o questionamento sobre a verdade em diagnósticos anatomopatológicos, já que todos os métodos de treinamento de sistemas computacionais foram baseados em diagnósticos visuais. A literatura apresenta vários algoritmos para abordagem desta questão, a maioria deles oriunda da área de reconhecimento de padrões (123-130).

As operações de aprendizado automatizado alcançaram elevado nível de complexidade. No sistema TICAS, um programa de treinamento automatizado era capaz de

delinear um esquema de classificação hierárquica envolvendo 25 categorias de critérios e mais de 15000 imagens de citopatologia cervical nas coleções de treinamento (131, 132). Foi também demonstrado que uma relação estequiométrica entre a quantidade de corante e o substrato por ele corado não era necessária(133). Métodos de coloração capazes de gerar resultados constantes e reproduzíveis permitiriam a utilização de mensurações de textura nuclear. Porém artefatos de fixação e coloração, ausência de procedimentos de controle de qualidade e até mesmo a caracterização precisa da composição química de corantes ainda são obstáculos no caminho da padronização da metodologia. Já a captura de imagens tem apresentado avanços decisivos. Em 1936, os procedimentos fotométricos de Caspersson eram baseados em fotografias, onde mensurações de pequenas regiões eram realizadas manualmente, com procedimentos de calibração extremamente tediosos e lentos. Após essa etapa, horas adicionais eram necessárias para os cálculos, empregando-se réguas de cálculo e tabelas de logaritmos. Em 1964 a empresa Zeiss ofereceu o primeiro sistema microscópico capaz de efetuar rastreamento de lâminas, o microscópio Zeiss UMSP1 (134). Tal sistema permitia a velocidade de captura de 15 elementos de imagem por segundo. A captura de imagens é apenas a primeira etapa do processo e hoje a tecnologia de videomicroscopia permite a captura de vários milhões de *pixels* por segundo a preços cada vez mais competitivos. A tendência atual é a integração dos elementos de captura, conhecidos como CCDs (Charge Coupled Devices), ao dispositivo conversor de sinais analógicos em digitais (conversor A/D) em um mesmo componente, denominado câmara digital. Novas tecnologias na fabricação de circuitos integrados permitirão a redução ainda mais acentuada de custos. Sistemas automatizados dependem basicamente da capacidade de processamento de dados, que deve ser elevada o suficiente para permitir a implementação desses sistemas de maneira realmente efetiva e economicamente viável em laboratórios de patologia. Os avanços no processamento de dados nas últimas décadas tem sido impressionantes. Quando

os primeiros computadores laboratoriais foram implementados, como o DEC LINC 8 ao microscópio Zeiss UMSP1 da Universidade de Chicago, a velocidade de processamento era limitada a 100 elementos de imagem por segundo. As estações de trabalho existentes hoje permitem processar 10^{12} a 10^{13} elementos de imagem por segundo ou mais. O que é ainda mais importante, computadores pessoais de arquitetura compatível com o padrão IBM-PC (*International Business Machines Corp. -Personal Computer*), equipados com placas de captura de imagem já são capazes de processar 10^9 elementos de imagem por segundo a custos inferiores a dois mil dólares. Esse poder de processamento é necessário em várias tarefas de processamento e análise de imagem. Um arquivo de imagem cobrindo uma área de 4 cm^2 em uma lâmina e resoluções de 4 elementos de imagem por micrômetro possui $1,6 \times 10^9$ elementos de imagem. Mesmo aplicações que utilizem informações disponíveis em áreas muito menores podem necessitar de grandes capacidades de processamento, pois a correção e segmentação de centenas ou milhares de arquivos de imagem por observadores humanos é, muitas vezes, uma tarefa impossível.

Para tais aplicações, sistemas de visão automática com segmentação de imagens guiada por conhecimento (*knowledge-guided systems*) se tornam essenciais. E, em tais sistemas, as capacidades elevadas de processamento são muito vantajosas. Um protótipo existente na Universidade do Arizona requer um bilhão de instruções por arquivo de imagem para segmentar corretamente um corte histológico de tecido prostático, sob a orientação de um sistema especialista (*expert system*). O desempenho desse sistema é bastante elevado. Em imagens de lesões bem diferenciadas com uma média de 35000 núcleos, diferenças significativas entre a segmentação realizada manualmente e pelo sistema especialista não ocorreram em mais de 3 % dos núcleos (135). Isso demonstra que a segmentação de imagens pode ser realizada com grande eficiência por sistemas

especialistas, permitindo a futura derivação de sistemas de classificação de lesões baseados na avaliação exaustiva de conjuntos de critérios diagnósticos. Tais sistemas poderão, no futuro, atingir níveis de desempenho superiores à avaliação visual por um único observador (136).

Como já foi discutido, o problema maior envolve a seleção adequada de áreas de interesse para avaliação automática nas imagens. Tal questão permanece em aberto tanto com relação a métodos estatísticos como a própria metodologia empregada em patologia, igualmente incapaz de esclarecer esse ponto crucial.

A questão envolvendo o uso de computadores para diagnóstico em patologia tem sido muito provocativa e determinado fortes reações emocionais entre alguns praticantes da chamada arte da patologia. O conhecimento de procedimentos estatísticos e teoria da informação demonstra que isso pode ser feito, mas desloca a questão para um território onde a observação visual também é limitada: a interpretação clínica de informações visuais. No final da década de 70 o projeto TICAS passou a avaliar as possibilidades da aplicação de computadores na automação da citopatologia da cérvix uterina para o rastreamento do câncer de colo uterino.

1.6 Novas abordagens

A ciência da informação busca a compreensão e sistematização de procedimentos e decisões baseados em dados, que podem ser numéricos ou descritivos, existir em forma lingüística, sendo precisamente definidos em cada um desses casos. Tais características tornam essa nova área uma ferramenta adequada na exploração do processo diagnóstico em patologia. Dados podem ser transferidos, distribuídos, ampliados ou atualizados em velocidades cada vez mais elevadas na era da tecnologia digital. Esses dados podem ser também exaustivamente pesquisados. Os procedimentos envolvidos na colheita e processamento de dados podem ser reproduzidos, o que permite o desenvolvimento de sistemas capazes de decisões diagnósticas.

Informação pode ser considerada uma propriedade semelhante à energia. Assim como energia é definida operacionalmente como a capacidade de realizar trabalho, a informação pode ser definida como a capacidade de organizar um sistema (34). Esse conceito é uma tentativa de abordar fenômenos estudados por múltiplas áreas da ciência, como por exemplo a estrutura subatômica, o DNA, oncologia, astrofísica, a mente humana e seus produtos como a linguagem, dentre muitos outros. Todos esses fenômenos mostram ordem em maior ou menor grau, sem excluir a existência de sistemas complexos e sistemas caóticos.

Qual é a necessidade de uma teoria, ou como alguns já postulam, uma ciência da informação? Até os anos 50, não havia a necessidade de um conceito de informação. Mas o advento dos sistemas de telefonia em escala mundial e, depois, das redes de computadores

tornaram tal conceito necessário. Avanços em outras áreas como a Biologia também tornaram interessante a formulação de uma teoria sobre tal elemento principalmente após 1953, quando Watson e Crick começaram a desvendar os segredos do DNA, um dos exemplos mais impressionantes de uma estrutura organizada para codificar quantidades maciças de informação. O DNA é uma demonstração da realidade física da informação. Hoje, laboratórios em vários países realizam o mapeamento dos três bilhões de pares de bases do genoma humano, uma tarefa que se torna mais veloz como resultado dos avanços das técnicas de biologia molecular e da própria teoria, ou ciência da informação. E a Internet permite o acompanhamento quase simultâneo dessa investigação (137, 138).

A distribuição da cromatina nuclear segue padrões definidos. Os valores de densidade óptica refletem, em sua distribuição espacial, uma estrutura de dependências(139) específica, que encontra suporte no estudo ultraestrutural da cromatina e matriz nuclear. Núcleos que apresentam grânulos densos de cromatina podem alternar áreas de elevada densidade óptica com outras onde a densidade é baixa. São os padrões de distribuição e a estrutura de dependência dos dados que refletem a distribuição de cromatina, também denominada textura e o estado funcional da célula. Exemplos mais simples de estruturas de dependência podem ser encontrados na linguagem e música escritas. Cada linguagem escrita é caracterizada por ocorrências concomitantes, denominadas co-ocorrências específicas de símbolos, como o “nha” e “lha” em português, o “th” em inglês e o trigramas “lla” em espanhol. A figura 7 mostra um exemplo simples e dramático de modificação de estrutura de dependência.



Figura 7. A informação contida na figura 8A codifica a abertura da célebre Quinta Sinfonia em Dó menor de Beethoven. A figura 8B tem exatamente a mesma quantidade de informação que 8A, mas com a ordem das notas musicais alterada, o que exemplifica uma modificação de estrutura de dependência. Um método quantitativo sem a capacidade de avaliar adequadamente a estrutura de dados poderia classificar as informações de A e B em uma mesma categoria, já que a quantidade de informação é idêntica nas duas figuras.

Uma imagem digital com seus valores de densidade óptica é um equivalente bidimensional da linguagem escrita, onde tais valores podem ser considerados símbolos diferentes. Núcleos em estados funcionais diversos são caracterizados por estruturas de dependência de densidade óptica diferentes.

O histograma de valores de densidade óptica é uma representação estatística dita de primeira ordem: ela apenas expressa o número de elementos de imagem na mesma faixa de densidade óptica e considera essas ocorrências como independentes. Matrizes de co-ocorrência são representações estatísticas de segunda ordem, que consideram a frequência relativa da co-ocorrência de valores de densidade óptica de diferentes faixas, que podem ser considerados diferentes símbolos ou letras. É importante observar que as

matrizes de co-ocorrência permitem avaliar esquemas de dependência em diferentes direções de uma imagem digital. Se a análise citoquímica permite estimar a quantidade de determinada substância em um tecido, a análise de imagem permite identificar a ocorrência e distribuição de determinadas características presentes no núcleo celular.

A avaliação microscópica de cortes histológicos e esfregaços celulares é baseada na experiência diagnóstica do patologista. O sucesso do método depende da integração de imagens disponíveis na memória visual do observador, conhecimentos histológicos e de etiopatogenia, avaliação de dados de história, exames físico e complementares e possíveis efeitos de intervenções terapêuticas, dentre outros aspectos. Baseada nesse método, a patologia alcançou elevado nível de desempenho e provê diagnósticos adequados na maioria das situações. Uma das limitações da patologia é que o conhecimento se desenvolve e existe em indivíduos, sendo de difícil transferência para outros especialistas. A explanação detalhada dos processos decisórios envolvidos na avaliação diagnóstica é difícil e parte do conhecimento diagnóstico envolvido muitas vezes tem descrição complexa e pouco compreensível. Além disso, elementos do raciocínio dedutivo podem não possuir explicação lógica (140), sendo baseados na experiência pessoal. Todas essas características evidenciam a natureza subjetiva do processo de decisão diagnóstica.

A patologia é uma dentre várias especialidades cuja complexidade desafia a ciência da informação, uma área que está em seus estágios iniciais de desenvolvimento, assim como os sistemas de processamento de informação com capacidade de “compreensão”. Compreender em patologia é um processo que vai muito além da informação oferecida por cortes histológicos e imagens microscópicas. É necessário integrar

toda a informação que possa ser utilizada no processo decisório realizado por seres humanos e ainda a informação necessária para que o sistema obtenha os detalhes diagnósticos da imagem microscópica.

A necessidade de integrar grandes coleções de dados a uma situação diagnóstica específica e desenvolver um procedimento inferencial capaz de tomar decisões é um grande desafio. Isso requer uma definição completa de todas as dependências mútuas entre os elementos da informação disponível. O desenvolvimento dos sistemas de automação de raciocínio e inteligência artificial ainda não atingiu o estágio em que possam oferecer compreensão de situações complexas.

Praticamente todo o conhecimento tradicional em patologia existe na forma de conceitos, sejam imagéticos, termos descritivos ou conhecimento de dependências causais. Muito poucos conceitos utilizados normalmente tem formato numérico. Como descrito acima, alguns conceitos podem ser traduzidos em tal formato. Mas, para que a avaliação diagnóstica e prognóstica possa utilizar toda a informação disponível, é evidente que outras informações não disponíveis formato numérico devem ser utilizadas. Sistemas diagnósticos devem processar e utilizar essas informações na tomada de decisões.

Em engenharia de automação, diz-se que: “todos procedimentos que podem ser realizados por uma máquina podem ser realizados de forma ainda mais eficiente por outra máquina”. Em patologia, surgem importantes questões diretamente relacionadas a tais procedimentos realizáveis por uma máquina, tais como:

O que pode ser realizado por uma máquina no processo de avaliação de um espécime?

Os processos complexos de avaliação diagnóstica realizados pelo patologista em sua rotina são totalmente compreendidos?

Serão eles a única forma de praticar patologia?

Será a ciência da informação capaz de fornecer ao patologista novos dados nunca antes acessíveis?

Poderá a ciência da informação aumentar a capacidade de detecção e percepção de fenômenos?

Quantificar em patologia envolve mensuração, o que é prontamente associado a dados numéricos. De fato, em grande número de situações, entidades e conceitos histopatológicos correspondem diretamente a características mensuráveis e expressas em números. A área de um núcleo, por exemplo, é prontamente medida e expressa em elementos de imagem ou micrômetros quadrados. Tais valores podem ser comparados a uma população de referência e classificados como normais ou compatíveis com macronucleose, por exemplo. Outros conceitos em patologia, como células indiferenciadas, também podem ser expressos em formato numérico, dependendo da avaliação de diferentes características teciduais e nucleares, como grau de aleatoriedade da disposição de núcleos em um tecido, área nuclear e padrão de disposição de cromatina. Um dos grandes desafios da patologia quantitativa é a definição de tais “transformações numéricas” interpretativas (112), onde dados numéricos são traduzidos em conceitos diagnósticos descritivos por algoritmos precisamente definidos.

Mensurações podem adicionar achados valiosos através do estudo da estrutura de dados (141). Essa estrutura pode revelar a presença de um subgrupo de dados com características inesperadas. A estrutura de dados pode ainda revelar a direção das mudanças, pois as características de distribuição dos dados podem apontar para padrões encontrados em células malignas.

Com a evolução da teoria da informação, a quantificação não está mais restrita a dados numéricos. Sistemas especialistas já permitem procedimentos de tomada de decisões baseados em termos histopatológicos genéricos e imprecisos, tais como difuso, focal ou marcado. Os sistemas especialistas estabelecem escalas de conclusões possíveis, em algumas situações baseadas em dados numéricos ou funções computadas para a distância entre termos descritivos, ou seja: dados essencialmente não numéricos (142-148). Uma variação dos sistemas especialistas são as chamadas redes inferenciais. Tais redes permitem a combinação de diferentes evidências, todas expressas em termos descritivos, fornecendo o resultado como a probabilidade para diferentes alternativas diagnósticas (136, 149, 150). Ainda, a maior parte das limitações relacionadas a procedimentos de análise numérica multivariada pode ser solucionada através da utilização de métodos de raciocínio baseado em casos (151). No método de raciocínio baseado em casos, a quantificação é utilizada na avaliação prognóstica específica do paciente, baseada em medidas de similaridade e distâncias de casos precedentes.

Existem amplas evidências de que a quantificação pode extrair informação diagnóstica e prognóstica adicional. O sucesso da avaliação visual na maioria das situações provoca resistência em aceitar que tal método não produz níveis elevados de reprodutibilidade em todas as situações. Uma das justificativas para o estudo das aplicações

da quantificação em patologia é aumentar a consistência e reprodutibilidade diagnóstica e prognóstica, o que é reforçado pelo número considerável de trabalhos na literatura que avaliam a dificuldade em se obter consenso diagnóstico mesmo entre observadores experimentados para uma grande variedade de situações na patologia (58). Rosai (152) publicou um trabalho mostrando um baixo nível de consenso diagnóstico em lesões benignas de mama. Os métodos quantitativos serão mais valiosos em tais situações, caracterizadas pela correção diagnóstica de difícil estabelecimento.

Nos últimos anos, a ênfase no uso da quantificação tem se deslocado para a aplicação de métodos baseados na informação em formatos não numéricos. Novos métodos para o manejo da incerteza em sistemas diagnósticos tem sido desenvolvidos (153). A metodologia empregada nos sistemas especialistas tem sido adaptada para o uso de classificações descritivas. Sistemas baseados no teorema de Bayes (154) tem sido utilizados para combinar evidências diagnósticas em patologia de maneira que a estrutura de dependência condicional permaneça intacta, o que permite a utilização de computadores (150).

Claramente a pesquisa na área de patologia quantitativa está iniciando uma fase onde o conhecimento histopatológico está sendo integrado ao processo de tomada de decisões. A aplicação dessas novas tecnologias torna mais evidentes os problemas de comunicação entre diferentes áreas. Os métodos disponíveis para análise de imagens microscópicas tem suas origens em áreas como a estatística, desenho experimental, morfologia matemática, álgebra, sistemas especialistas, gerenciamento de dados, manejo da incerteza, teoria de conjuntos difusos (*fuzzy set theory*) e muitos outros. Cada uma dessas áreas desenvolveu seus próprios termos técnicos. Para a patologia tais métodos são

ferramentas, e as terminologias utilizadas nessas áreas são, em sua maior parte, completamente desconhecidas para o patologista. As possibilidades de tais métodos só podem ser corretamente exploradas através de uma abordagem multidisciplinar com troca de informações entre diferentes especialistas. Representações adequadas do conhecimento histopatológico são necessárias. A complexidade de sistemas como núcleos celulares, tecidos, órgãos ou pacientes é muito grande e sempre crescente. A compreensão de fenômenos em biologia e patologia começa a exigir a aplicação de conceitos antes restritos a áreas como a Física, como os sistemas complexos.

1.7 Sistemas complexos

Um novo ramo multidisciplinar procura demonstrar que o universo é maior do que o somatório de seus constituintes. A tal esforço em decifrar ordem em um cosmos caótico foi dado o nome de ciência da complexidade, que começa a ser integrada com a ciência da informação. Sistemas complexos tem duas características fundamentais: a irreversibilidade e a ausência de linearidade. A irreversibilidade implica na existência de um meio onde os eventos acontecem em apenas uma direção. Esse meio é o tempo. A irreversibilidade é observada com facilidade a nível macroscópico, onde a passagem do tempo pode ser percebida sem dificuldades em eventos como o envelhecimento da pele. Mas as leis do movimento utilizadas para descrever o comportamento da matéria a nível microscópico não distinguem uma direção do tempo da outra. Embora a irreversibilidade pareça um fenômeno óbvio, só em 1998 foi demonstrada pela primeira vez a irreversibilidade do tempo a nível microscópico (155, 156).

O segundo elemento da complexidade é a ausência de linearidade. Sistemas lineares tem sido o objeto da ciência pelos últimos trezentos anos. Tais sistemas obedecem regras simples de adição. Uma torneira com fluxo de água constante drena o dobro do volume no dobro do tempo. Basta comparar esse exemplo de sistema linear com os fenômenos não-lineares que regulam a quantidade de água no corpo humano. A não-linearidade causa alterações mínimas em um nível do sistema que podem determinar imensas modificações no mesmo e em outros níveis. Tal fenômeno geralmente provoca resultados complexos e inesperados. A irreversibilidade e não-linearidade caracterizam fenômenos em todas as áreas da ciência. E a atenção para tais características na área da Biologia foi antecipada por pesquisadores de outras áreas, notavelmente o físico Erwin Schrödinger em 1943(157). Mas foi o advento do computador digital e seus avanços nas últimas décadas que permitiram tornar tratáveis muitas questões envolvendo sistemas complexos. Problemas como a determinação das variações da frequência cardíaca e seqüência de descargas de neurônios a nível cerebral, dentre outros, só podem ser abordados com sucesso a partir dos conceitos de complexidade e com o desenvolvimento modelos computacionais. O genoma humano, com seus três bilhões de pares de bases é outro exemplo de sistema complexo, e a compreensão do funcionamento de tal repositório de informação incluirá métodos de análise desenhados para tais sistemas. A oncologia molecular é a explicação unificadora para o câncer(158), mas também deve ser compreendida como o estudo de um sistema não-linear, caracterizado por múltiplos mecanismos de retroalimentação.

Sistemas complexos não podem ser caracterizados por conceitos precisos, conforme a descrição de Zadeh (159): “à medida em que a complexidade aumenta, conceitos precisos perdem significado e conceitos significativos perdem precisão”. Esse é o

embasamento teórico da teoria dos conjuntos difusos, que permite a caracterização de sistemas de grande complexidade quando a precisão de conceitos perde o significado. Exemplos típicos da patologia onde a precisão perde significado são os termos como: pronunciado, moderado, severo, focal, aplicáveis a inúmeras situações diagnósticas. O uso de termos vagos não impede caracterizações específicas de processos patológicos. Obviamente termos como “moderado” não são precisos o suficiente para caracterizar qualquer situação de maneira inequívoca. Mas seu uso em conjunto com outros termos vagos resulta muitas vezes em combinações altamente específicas que definem situações anatomopatológicas.

Este trabalho procura integrar a patologia com a análise de imagem e a ciência da informação na busca de novas metodologias para classificar, identificar e derivar curvas de progressão de processos patológicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar núcleos celulares de forma específica através de um método de visualização de parâmetros de textura de cromatina que permita avaliar alterações teciduais através do grau de desvio da normalidade.

2.2 Objetivo específico

Aplicar esse método a lesões prostáticas com reconhecido potencial de progressão maligna, áreas vizinhas e também regiões apresentando adenocarcinomas em etapas de invasão precoce (microinvasão).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O tecido prostático foi utilizado por apresentar características citológicas e arquitetura tecidual que permitem o desenvolvimento de métodos aplicáveis a outros órgãos, tecidos, preparados histológicos e citológicos sem modificações de metodologia, o que inclui todos os métodos investigativos em anatomia patológica e citopatologia pleuro-pulmonar disponíveis. Além disso, a patologia prostática foi o modelo inicial para desenvolvimento de tecnologia em análise de imagem no laboratório de imagens biomédicas do Centro de Ciências Ópticas da Universidade do Arizona desde 1994(160-163), sendo os estudos totalmente financiados e supervisionados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-NIH) através da concessão CA35 53877 feita a Peter H. Bartels. Em 1998 o método começou a ser aplicado a outros órgãos, como mama(164), pele(165) e esôfago.

3.1 Delineamento do Estudo

Foi realizado um estudo transversal no qual foram estudadas as características de textura nuclear de núcleos celulares em diferentes áreas de diferentes espécimes cirúrgicos. O padrão foi o diagnóstico anatomopatológico por microscopia óptica convencional.

3.2 População estudada

Foram utilizados espécimes dos arquivos do Instituto de Patologia da Universidade de Ancona, Itália. Foram selecionados 32 espécimes cirúrgicos obtidos através de prostatectomias ou cistoprostatectomias e todo o material dos espécimes foi examinado para excluir outros processos patológicos. Os pacientes tiveram acompanhamento clínico por cinco anos ou até o óbito, com necropsia. Do total, sete casos apresentavam tecido normal, onze casos continham neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIP) de baixo grau, outros sete exibiam NIP de alto grau e três apresentavam adenocarcinoma prostático. Quatro casos com glândulas apresentando NIP de alto grau e invasão precoce (166) foram também utilizados.

3.3 Preparação do material

Fixação e documentação: foram realizadas a identificação, demarcação de margens de excisão com tinta da Índia, descrição macroscópica, fotografia, secção parcial dos espécimes e fixação com formalina tamponada a 10 %, por 24 a 30 horas.

Processamento do material: o material foi preparado através das técnicas convencionais de inclusão em parafina e cortes homogêneos de 5 micrômetros de espessura em micrótomo.

Procedimentos de coloração: foram utilizadas as técnicas de hematoxilina e eosina de Mayer (167) e imunohistoquímica com peroxidase-antiperoxidase (anticorpo anti-queratina 34betaE12) (168).

3.4 Classificação diagnóstica

Os diagnósticos foram estabelecidos através do consenso entre dois patologistas utilizando critérios morfológicos estabelecidos na literatura(169). Os casos foram classificados como:

- tecido normal;
- neoplasia intraepitelial prostática de baixo e alto graus (NIP-BG e NIP-AG);
- casos apresentando NIP-AG com áreas de microinvasão, denominados adenocarcinomas prostáticos com invasão precoce;
- adenocarcinomas da próstata.

Todos os casos foram estudados através de coloração de hematoxilina e eosina e anticorpo monoclonal anti-queratina 34betaE12 (Dako, Carpinteria, CA, EUA), direcionado para queratinas de alto peso molecular. Este anticorpo é utilizado para delineamento da camada de células basais da próstata (170-172). O epitélio prostático normal invariavelmente reage com este anticorpo e a circunferência da camada de células basais fica delineada continuamente. Rupturas, caracterizadas pela descontinuidade na coloração pelo 34betaE12 ao longo da camada de células basais são observadas em 56% dos

casos de NIP de alto grau e mais comumente em ácinos com lesões de alto grau adjacentes a áreas com adenocarcinoma de próstata do que em áreas mais distantes (166, 173). A descontinuidade da camada de células basais aumenta em relação direta com o grau de NIP, com perda de mais de um terço da camada basal em 52% dos focos de NIP de alto grau. As áreas de adenocarcinoma com invasão precoce são caracterizadas pela inequívoca protrusão do ácino através do estroma em áreas de descontinuidade da camada de células basais (166, 174). No entanto, a integridade da lâmina basal é preservada mesmo na etapa de invasão precoce(166). A figura 8 apresenta a seqüência de alterações morfológicas do epitélio prostático normal através de graus progressivos de neoplasia intraepitelial até o carcinoma com foco de invasão precoce.

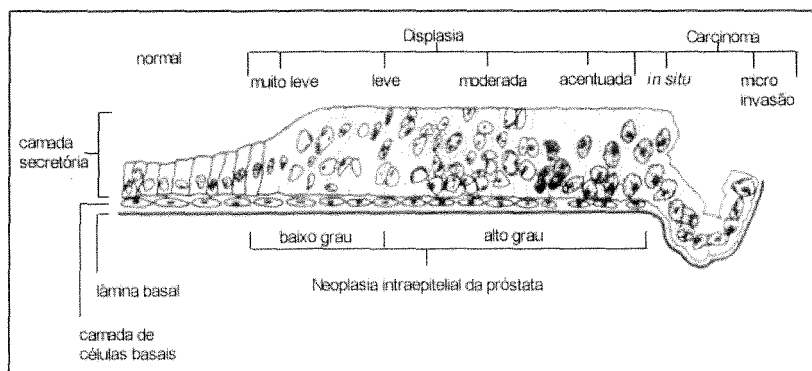


Figura 8. Sequência morfológica proposta para carcinogênese na próstata humana. De acordo com o conceito de progressão, NIP de grau 1 corresponde a displasia muito leve e leve. NIP grau 2 corresponde a displasia moderada e NIP grau 3 a displasia acentuada / carcinoma *in situ*. O estágio precursor do carcinoma de próstata é encerrado quando ocorre microinvasão, o que caracteriza o adenocarcinoma com invasão precoce. Modificado de Bostwick e Brawer (166).

3.5 Sistema de captura de imagens (VÍdeo fotômetro)

Sistemas de captura de imagens são compostos por quatro elementos: o componente óptico (microscópio), videocâmara, placa de captura e microcomputador(175).

Imagem é o termo que define a representação espacial de um objeto em duas ou três dimensões. Uma imagem pode ser real ou virtual, como a imagem ótica. Toda imagem obtida através de uma videocâmara (CCD ou *charge coupled device*) é formada por sinais eletrônicos que permitem sua reprodução basicamente através de um tubo de raios catódicos, como um televisor. Imagem digital é o produto da divisão da imagem em uma matriz finita de duas dimensões, composta por elementos de imagem ou *pixels*. Este formato é criado através de placa digitalizadora conectada ao elemento gerador de imagens (CCD). A placa define o valor da tonalidade de cada elemento de imagem (*pixel*).

Componente ótico: 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 lentes objetivas plano-apocromáticas de 20 aumentos e abertura numérica (A.N.) de 0.75 (NIKON, Melville, NY, EUA). O microscópio Zeiss foi equipado com objetivas plano-apocromáticas 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.

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(176) (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 Sparestation 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.

3.6 Metodologia de extração de características de textura nuclear

As imagens de média resolução (200x) foram impressas em papel e as áreas de interesse foram demarcadas. Esse procedimento permitiu uma redução no tempo de captura dirigida e aleatória das áreas de interesse. Essas áreas foram segmentadas e interpretadas através de dispositivo de visão computacional baseado em sistema especialista (177) (*knowledge-based machine vision system*) desenvolvido pelo Centro de Ciências Ópticas do Arizona (114). A figura 9 mostra a seqüência de segmentação de parte de uma glândula prostática adjacente a um adenocarcinoma.

As imagens de alta resolução (630x) foram obtidas de células secretórias relacionadas a camadas basais intactas de tecido livre de qualquer lesão prostática, próstatas com NIP de baixo e alto grau, adenocarcinomas com invasão precoce e adenocarcinomas prostáticos, totalizado 5.045 núcleos celulares. As imagens foram então revisadas e arquivadas para extração de características de textura nuclear. Um filtro de interferência em 610 nm (vermelho) foi utilizado para aumentar o contraste dos cortes corados por hematoxilina e eosina. A resolução digital foi de seis elementos de imagem por micrômetro nas imagens de alta resolução.

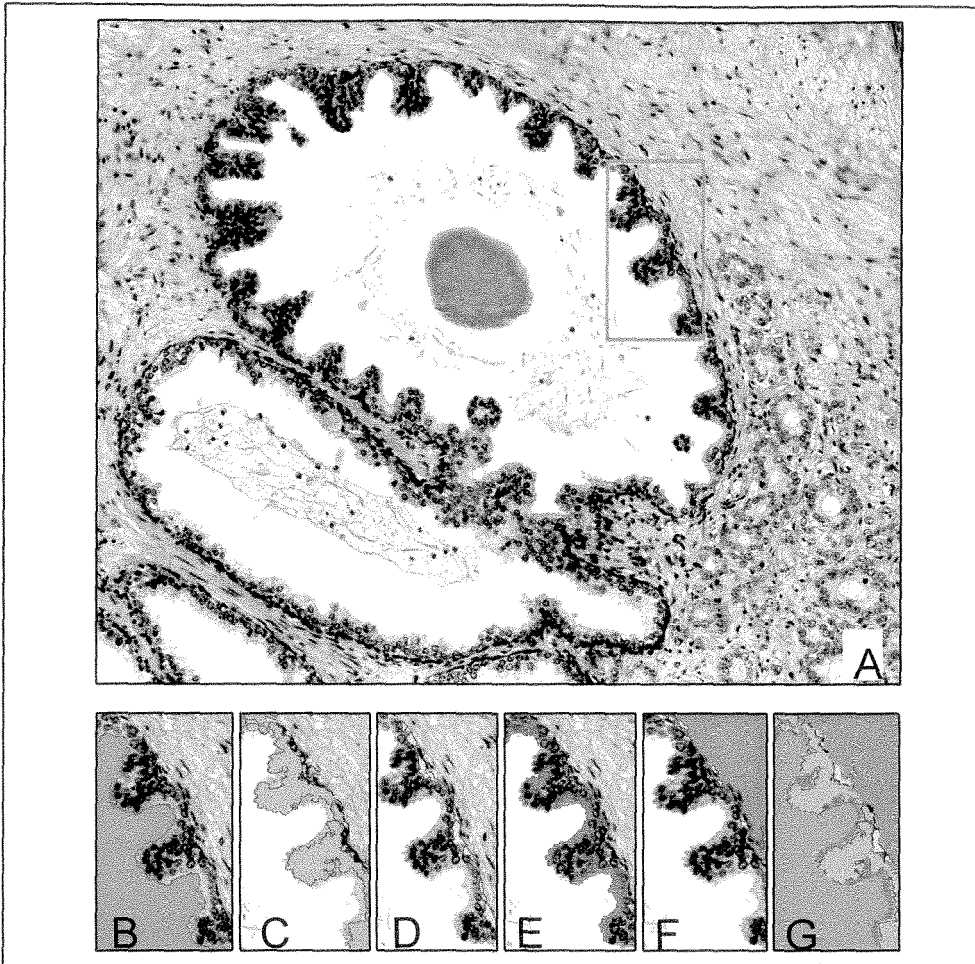


Figura 9. Sistema de visão computacional do Centro de Ciências Ópticas da Universidade do Arizona. A figura 10A mostra uma glândula contígua a um adenocarcinoma de próstata (abaixo à direita). A área em verde delimita uma parte da imagem segmentada pelo sistema automático. 10B. Identificação do lúmen (azul). 10C. A área que contém células glandulares secretoras (em verde). 10D. Regiões com células basais positivas para 34betaE12 (amarelo). 10E. Porções citoplasmáticas das células secretoras (roxo). 10F. Estroma (marrom). 10G. Composição da área delimitada na figura 10A com todos os elementos identificados pelo sistema. O tempo total de segmentação e interpretação dessa imagem é de 0,04 segundos utilizando-se um computador Sun Sparcstation Ultra 2 com as especificações e configuração descritas no item 3.5.

3.7 Definição dos conjuntos de núcleos estudados

Foram determinados oito conjuntos de núcleos para estudo e cada um recebeu uma denominação abreviada, fornecida entre parênteses. Os cinco primeiros conjuntos são compostos por núcleos de tecido normal (normal/normal) e de NIP de baixo grau (NIP-BG), NIP de alto grau (NIP-AG), adenocarcinoma com invasão precoce (Microinv) e adenocarcinoma (Ca). Os três últimos conjuntos são compostos por núcleos celulares de glândulas de aparência histológica normal provenientes de casos com lesões de baixo (Normal/NIP-BG) e alto graus (Normal / NIP-AG) e adenocarcinomas de próstata (Normal/Ca).

Grupo normal (normal/normal)

Foram capturadas imagens de 1443 núcleos de células normais de áreas de tecido normal, portanto relacionadas a camadas basais íntegras, provenientes de sete indivíduos. Todos os espécimes foram obtidos através de cistoprostatectomias e não apresentavam NIP ou carcinoma prostático. Tais núcleos foram obtidos em glândulas selecionadas aleatoriamente, dentro de perímetros de 10 milímetros.

Neoplasia intraepitelial de baixo grau (NIP-BG)

Quinhentos e cinquenta e três núcleos de glândulas com NIP de baixo grau foram obtidos de onze espécimes.

Neoplasia intraepitelial de alto grau (NIP-AG)

Setecentos e quarenta e quatro núcleos de NIP de alto grau foram capturados do material de sete pacientes.

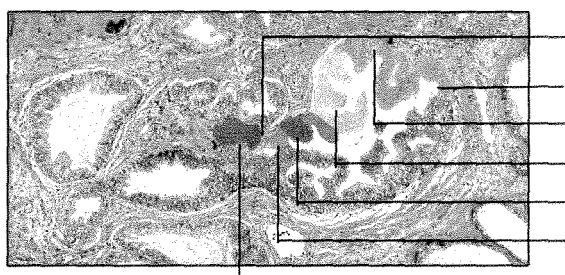
Adenocarcinoma de próstata com invasão precoce (microinv)

Quinhentos e quarenta núcleos foram obtidos de quatro glândulas apresentando adenocarcinomas com áreas de invasão precoce, em seis localizações determinadas, mostradas de forma esquemática na Tabela I. Uma glândula característica de cada um dos quatro casos de adenocarcinoma de próstata com invasão precoce foi selecionada. De cada área de microinvasão foram capturadas cerca de 55 células. Esse subconjunto foi denominado “INV”. O limite entre as áreas de NIP e microinvasão foi determinado e denominado “ponto zero”. A partir desse ponto foi realizada a contagem de núcleos relacionados à camada basal e capturadas imagens de aproximadamente 12 células de cada uma das seguintes áreas de cada uma das quatro glândulas: células a uma distância mínima de (os códigos entre parênteses correspondem à denominação de cada subconjunto):

- I. cinco núcleos do ponto zero (PROX);
- II. 10 e 15 núcleos do ponto zero (MED1);
- III. 25 e 35 núcleos do ponto zero (MED2);
- IV. 40 e 45 núcleos do ponto zero (MED3);
- V. células a mais de 45 núcleos do ponto zero (DIST).

Tabela I. Conjuntos e subconjuntos de núcleos celulares estudados. A terceira coluna indica o número de núcleos relacionados a camadas de células basais reagentes com o anticorpo 34Ebeta12. Os adenocarcinomas com invasão precoce (microinvasão) e adenocarcinomas não apresentaram células com tais características. A imagem mostra uma glândula com NIP de alto grau com área de microinvasão com os subconjuntos identificados. INV: área de microinvasão. PROX: área entre um e 5 núcleos do ponto de microinvasão. MED1: área entre 10 e 15 núcleos do ponto de microinvasão. MED2: área entre 25 e 35 núcleos do ponto de microinvasão. MED3: área entre 40 e 45 núcleos do ponto de microinvasão e DIST: área a mais de 45 núcleos do ponto de microinvasão.

Conjunto	Nº total de núcleos	Relacionados à camada intacta de células basais	Subconjunto	Nº de núcleos
Normal/normal	1.443	1.443	-	
NIP-BG	553	161	-	
NIP-AG	744	150	-	
Microinv	414	-	INV	223
			PROX	47
			MED1	48
			MED2	48
			MED3	48
Ca	150	-	-	
Normal/NIP-BG	783	783	-	
Normal/NIP-AG	457	457	-	
Normal/Ca	501	501	-	
Total	5.045			



Ponto zero (microinvasão)
 DIST
 MED3
 MED2
 MED1
 PROX
 INV

Adenocarcinoma de próstata (ca)

Cento e cinquenta núcleos celulares de três adenocarcinomas de próstata classificados como 5 (2+3) pelo método de graduação histológica de Gleason (178) foram capturados. A seleção de casos com essas características se deveu à existência de um ponto de corte arbitrado entre os escores 6 e 7 de Gleason com relação ao estadiamento. A partir do escore 7 a probabilidade de metástases em linfonodos é muito grande (179, 180).

Núcleos de glândulas de aparência normal em casos de NIP de baixo grau (normal/NIP-BG)

Dos onze casos de NIP de baixo grau foi obtido um conjunto de 783 núcleos celulares em grupos de 30 a 50 núcleos por glândula de aparência normal. Duas a três glândulas de cada caso foram selecionadas em uma faixa de 1 a 10 milímetros da área de NIP de baixo grau.

Núcleos de glândulas de aparência normal em casos de NIP de alto grau (normal/NIP-AG)

Um total de 457 núcleos foram capturados de sete casos, seguindo o mesmo método descrito para o conjunto normal/NIP-BG, em faixas de 0,5 a 7,5 mm das lesões.

Núcleos de glândulas de aparência normal em casos de adenocarcinoma de próstata (Normal/Ca)

Quinhentos e um núcleos provenientes de três casos foram obtidos de acordo com a técnica descrita para o conjunto normal/NIP-BG, atingindo a faixa de 1 a 6 milímetros de distância das lesões. A tabela I apresenta um sumário da origem dos 5.045 núcleos estudados.

3.8 Análise Estatística

Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis (181), métodos de análise de variância e análise de funções discriminantes (182). Os algoritmos para os métodos estatísticos utilizados foram implementados nos programas de computador baseados no sistema TICAS (121, 131) do Centro de Ciências Óticas da Universidade do Arizona (Tucson, AZ, EUA). Cálculos adicionais foram realizados através dos programas de computador Microsoft Excel 97 (Microsoft, Redmond, WA, EUA) e Statmost 2.5 (Datamost, Salt Lake City, UT, EUA).

3.9 Conceitos de assinatura nuclear, distância padronizada da população normal e distância padronizada ponderada da população normal

A seguir serão descritos os procedimentos de obtenção assinaturas nucleares, assinaturas de lesões, e os conceitos de distância média padronizada da população celular normal e distância média padronizada ponderada da população celular normal utilizados nesse trabalho. Como tais conceitos são originais, alguns resultados serão apresentados ao longo desta seção, com o objetivo de facilitar a compreensão de tais conceitos. As fórmulas matemáticas e algoritmos das 93 características de textura nuclear utilizadas estão no Apêndice. Essas características foram selecionadas a partir dos protocolos do projeto TICAS em função de suas frequências de ocorrência em mais de 200 mil células de diferentes órgãos e tecidos ao longo dos anos de duração do projeto. O projeto TICAS catalogou mais de 400 características morfométricas. E cada uma delas foi denominada por um algarismo arábico. Como já descrito, nesse trabalho foram utilizadas 93 características morfométricas e por isso a numeração dessas neste trabalho é descontínua. Por exemplo: a densidade óptica total é a característica 1, a área nuclear tem o número 2, a circularidade corresponde ao 3, RMS ao 4 e o histograma de densidade óptica até densidade 1,8 em valores percentuais corresponde às características entre os números 8 e 25. Portanto, as características de números 5, 6 e 7 dentre outras do sistema TICAS não foram utilizadas neste trabalho.

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 10 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.

Os histogramas agrupam conjuntos de características que representam desde grandezas físicas como área até os resultados de funções e relações que representam aspectos morfológicos de descrição verbal complexa ou mesmo impossível. Portanto o eixo das ordenadas da figura 10 expressa os valores em unidades arbitrárias.

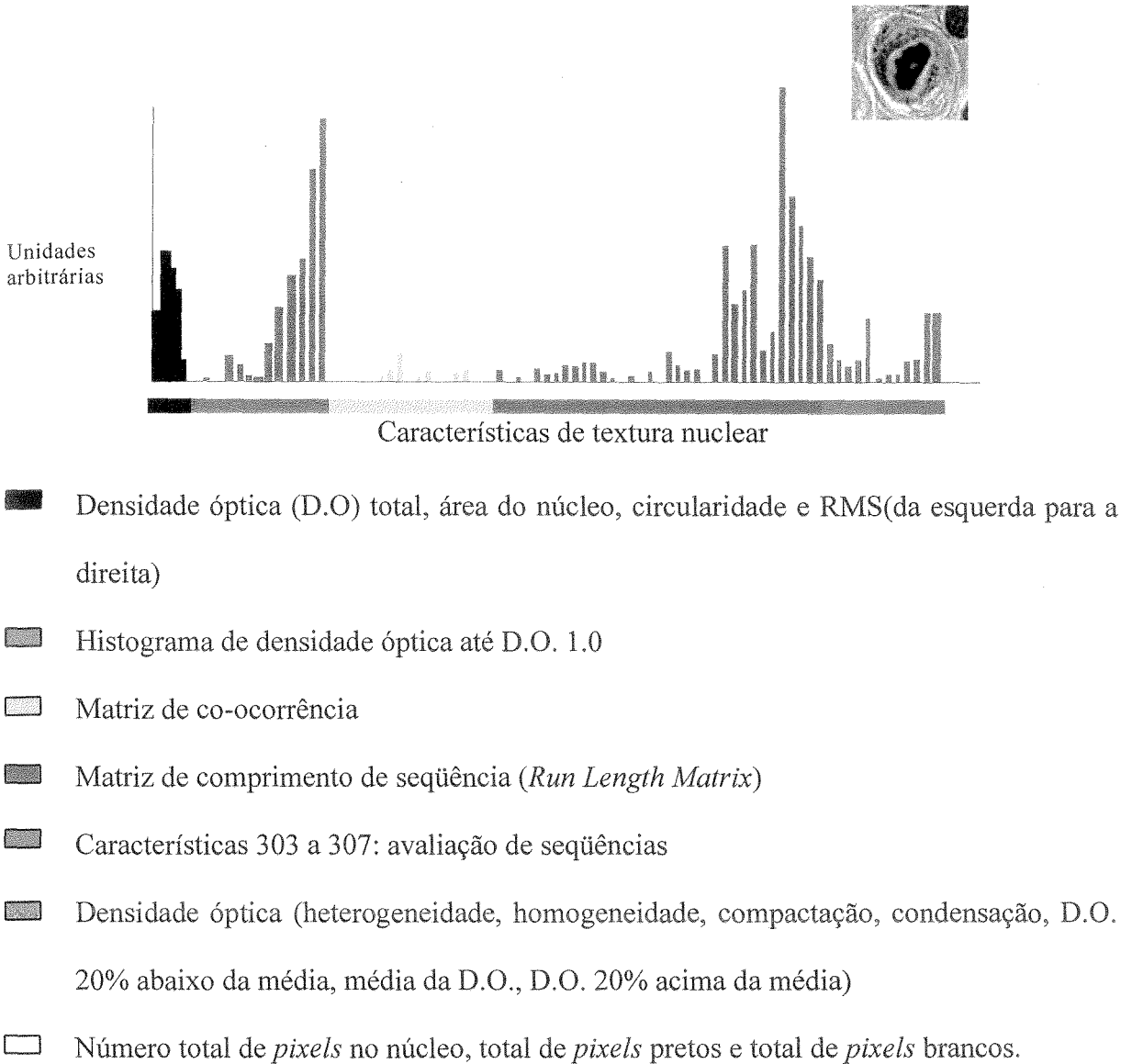


Figura 10. Assinatura nuclear de uma célula epitelial, representada no canto superior direito. As características de descritivas da densidade óptica total, área, circularidade e RMS estão representadas em preto e violeta . As matrizes de co-ocorrência e comprimento de seqüência tem, respectivamente, 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.

Análise de funções discriminantes

Os diagnósticos dos dois observadores foram utilizados para determinação de categorias diagnósticas. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado apenas para a seleção das 15 características nucleares mais significativas de cada categoria diagnóstica. As 15 características selecionadas da categoria normal e dos carcinomas foram utilizadas na geração de uma função discriminante. Essa função foi então aplicada a todos os casos individuais e categorias diagnósticas. Os valores resultantes da função discriminante foram então estudados por análise de variância.

As assinaturas nucleares podem ser aplicadas a núcleos individuais, a casos e categorias diagnósticas. Essas assinaturas foram obtidas a partir da análise de variância, que forneceu os valores para cada característica. O primeiro problema relacionado a tal metodologia foi a ampla faixa de valores que as características nucleares assumiram. Para se obter um perfil informativo era necessário que os valores ficassem limitados a uma determinada faixa, pois o interesse nas assinaturas nucleares estava em comparar núcleos celulares e categorias diagnósticas diferentes e não valores dentro da mesma assinatura digital, os quais, tal como descrito acima, representam vários elementos não comparáveis, como grandezas físicas, funções, matrizes, determinantes e outros.

Características com frequências muito baixas de ocorrência geram problemas de escala, já que muitas vezes elas oferecem informações importantes no contexto diagnóstico e não podem ser simplesmente omitidas. Tais características tendem a assumir valores progressivamente maiores em situações de anormalidade e valores extremamente baixos em núcleos da população celular considerada normal.

O problema pode ser ilustrado por um conjunto de valores da matriz de comprimento de seqüência de núcleos de um espécime normal e núcleos celulares de um caso de NIP de alto grau contidos na tabela II. Na faixa de baixa densidade óptica as características (285 a 290) tinham valores diferentes, mas, na maior parte das vezes, comparáveis. Na faixa de densidade óptica elevada, que nesse exemplo foram as características (267 a 272) que ofereceram informação discriminativa entre os dois núcleos, os valores foram muito baixos para o núcleo normal e elevados nos núcleos da NIP de alto grau.

Tabela II. Conversão de escala de características de textura nuclear (os valores são arbitrários e calculados de acordo com o respectivos algoritmos).

Característica	Fator de conversão	Próstata Normal (N= 250)		NIP alto grau (N=248)	
		Valor original	Valor após conversão	Valor original	Valor após conversão
2267	00,0001	3370,0	00,370	4450,7	00,450
2268	00,0001	1188,1	00,188	2280,8	00,281
2269	00,0001	772,92	00,073	1153,8	00,154
2270	00,0001	224,48	00,024	882,68	00,0827
2271	00,001	66,78	00,068	441,5	00,415
2272	00,001	22,67	00,027	552,59	00,526
2285	1,0	00,016	00,016	11,758	11,758
2286	1,0	00,012	00,012	11,064	11,064
2287	100	00,0001	00,01	00,287	228,79
2288	1000,0	00,00001	00,01	00,4545	4454,5
2289	1000,0	00,00001	00,01	00,0001	40,1
2290	1000,0	00,00001	00,01	00,0075	77,5

Para obtenção de conversão para uma faixa entre 0 e 1, o valor mínimo para registro visual seria de 0,01 como o atingido pela característica 288 em NIP de baixo grau. O fator de conversão utilizado seria de 1000, mas o resultado correspondente aos núcleos em NIP de alto grau da característica 288 atingiria 454,5. Como resultado teríamos uma característica de textura nuclear de valor extremamente elevado, praticamente dominando o histograma da assinatura digital. Porém, tais características não tiveram expressão constante para que tal escala pudesse ser mantida. Foi necessário estabelecer então um limite arbitrário que permitisse a extração de informação visualmente significativa. Após a verificação de todos os conjuntos de dados foi aplicada uma limitação de escala a duas unidades arbitrárias. A figura 11 mostra as assinaturas baseadas em um conjunto de características de textura para núcleos de células glandulares de próstatas normais e NIP de alto grau com limitação de valores no eixo das ordenadas.

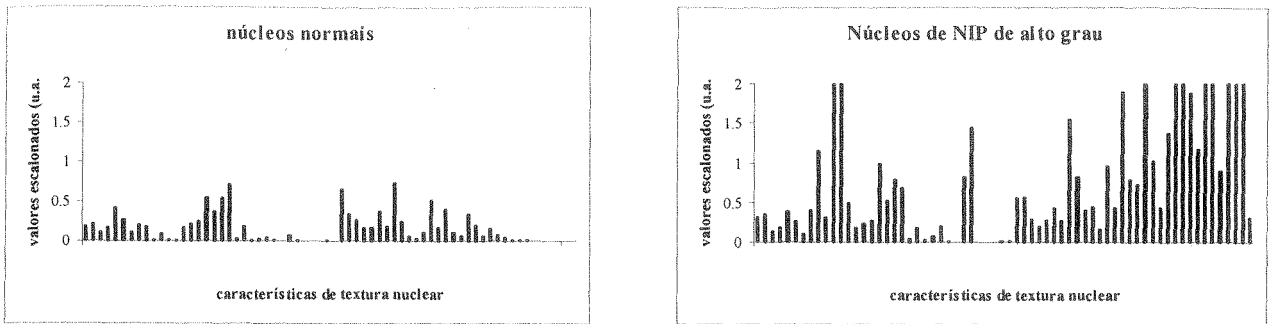


Figura 11. Assinaturas nucleares utilizando valores escalonados (unidades arbitrárias, u.a.) para as características de textura nuclear. Foi aplicada limitação de escala ao valor 2.

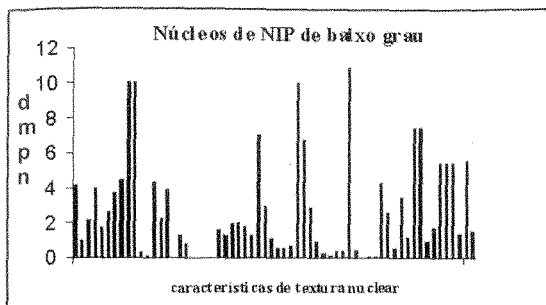
Das 93 características estudadas, 29 tiveram valor igual a zero em todos os conjuntos de dados e os histogramas da figura 11 mostram apenas os valores positivos. A limitação de escalas também foi incorporada na geração do histograma com distância média padronizada da população celular normal, que será descrito a seguir.

Distância média padronizada da população normal (dmpn)

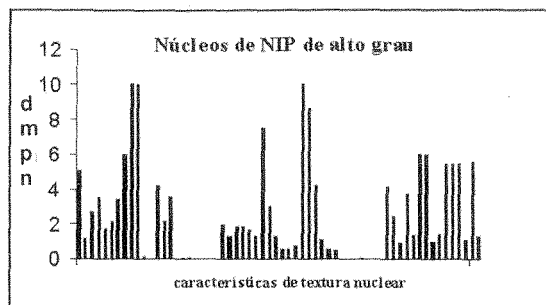
As assinaturas digitais de núcleos celulares podem oferecer informações mais úteis ao caracterizarem uma diferença ou desvio em relação a uma referência de normalidade. Uma redução de dados útil é o cálculo da distância média padronizada de um núcleo ou conjunto de núcleos considerando todas as características de textura nuclear. O termo distância média padronizada da população normal significa a média de cada uma das características nucleares mensuradas. Tal diferença pôde ser definida através da computação, para cada característica cariométrica de um núcleo ou conjunto de núcleos, a partir da diferença absoluta entre essa característica e o valor determinado para o conjunto

de células normais estudado. O resultado foi então dividido pelos desvios padrão correspondentes no conjunto de valores da população de referência, fornecidos pela análise de variância. A partir dessa operação, os valores das ordenadas dos histogramas passaram a ser valores z , expressos em unidades padronizadas de distância da população normal. Como as diferenças foram consideradas valores absolutos, mesmo os núcleos individuais, de casos e da população normais tiveram uma distância média padronizada diferente da assinatura nuclear de referência, que deriva de um núcleo teórico onde todas características nucleares apresentam distâncias da população celular normal iguais a zero.

A média aritmética entre os valores z de todas as características mensuradas tem como resultado uma nova redução de dados, substituindo o histograma por um único valor, que se pode observar sob os histogramas da figura 12, que mostra as assinaturas de núcleos de NIP de baixo e alto graus, similares em suas diferenças com relação à população normal.



$$dmpn = 3,4532$$



$$dmpn = 3,2365$$

Figura 12. Assinaturas de núcleos de NIP de baixo e alto grau após a padronização em relação a população normal (dmpn: distância média padronizada da população normal).

Cada barra do histograma corresponde ao valor da distância média padronizada da população para cada uma das 93 características de textura nuclear. O valor abaixo dos histogramas corresponde à média entre todas essas características. Esse valor traduz em formato numérico a semelhança entre as assinaturas de núcleos celulares de NIP-BG e NIP-AG.

Distância média padronizada ponderada da população normal

A distância média padronizada ponderada da população normal é o resultado do valor da média aritmética entre os valores de distância média padronizada da população normal e número total de núcleos incluídos em um grupo diagnóstico, sendo expressa em unidades de desvio-padrão da média (figura 13).

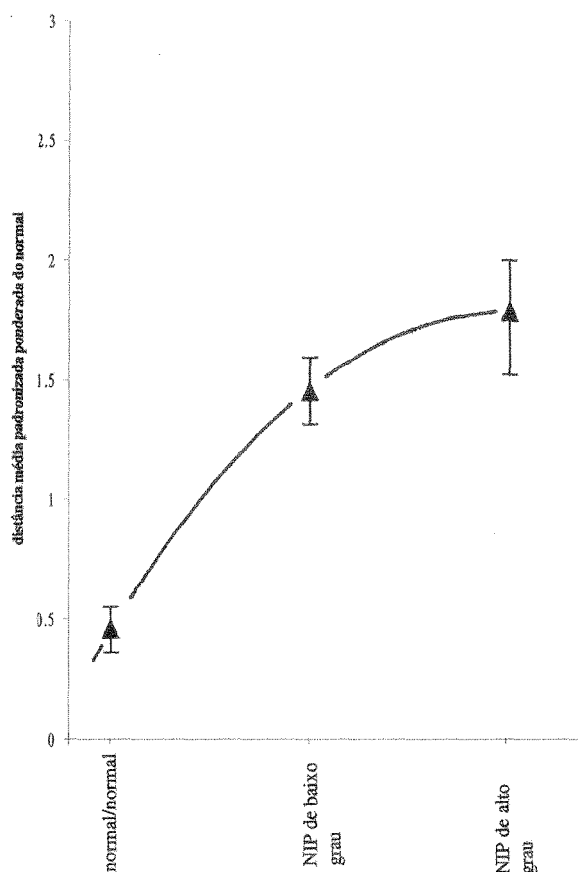


Figura 13. Distâncias médias padronizadas ponderadas da população normal, expressas em unidades de desvio-padrão, comparando casos normais, NIP de baixo e de alto grau, com os limites de confiança de 95%.

A figura 13 exibe os valores das distâncias médias padronizadas ponderadas para todos os núcleos de três categorias diagnósticas: normal, NIP de baixo e alto graus. Os núcleos das NIP apresentaram diferenças em relação à população normal de 1,5 a 2 desvios padrões em todas as características. Tais núcleos foram claramente diferentes dos núcleos

celulares da população normal, e os núcleos das neoplasias intraepiteliais de alto grau apresentam desvios maiores do que as populações de células das lesões intraepiteliais de baixo grau. A curva da figura 13 evidencia igualmente a tendência de progressão a partir da população normal até as NIP de alto grau. A figura 13 também é um exemplo das limitações dos métodos de classificação baseados nos procedimentos estatísticos existentes: os limites de confiança das categorias de lesões de baixo e alto grau estão sobrepostos, invalidando qualquer tentativa de classificação.

Assinaturas de padrão histológico

As assinaturas de padrão histológico são histogramas cujas abcissas se estendem por 4 unidades de desvio-padrão, sendo cada unidade de desvio-padrão dividida em cinco intervalos. Quanto maior o número de células anormais, maior a distância da população celular normal. As assinaturas de padrão histológico podem ser aplicadas a casos individuais e categorias diagnósticas. A figura 14 mostra dois exemplos de assinaturas de padrão histológico das categorias diagnósticas de células normais e dos casos de adenocarcinoma .

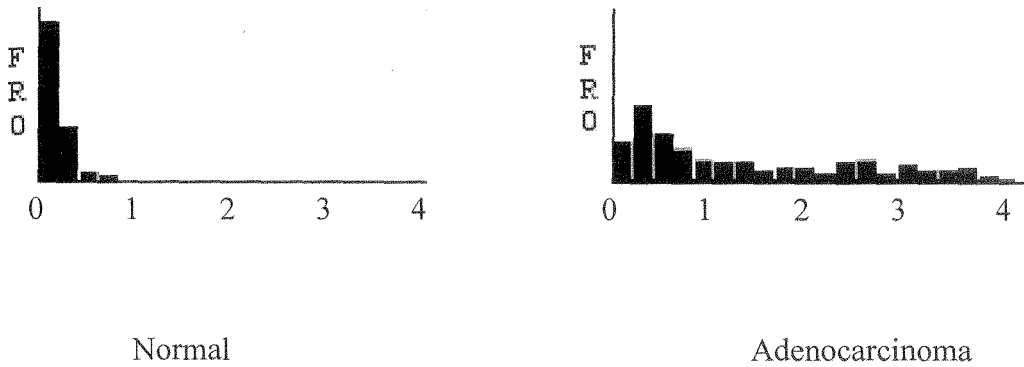


Figura 14. Assinaturas de padrão histológico de uma biópsia normal de próstata, à esquerda e de um adenocarcinoma prostático, à direita. As ordenadas indicam a frequência relativa de ocorrência de células (FRO). Para fins de visualização dos padrões de distribuição dos histogramas foi aplicada limitação de escala de 40% para as ordenadas das assinaturas de padrão histológico das categorias diagnósticas e 30% para casos individuais. As abcissas compreenderam quatro desvios padrão da população de células normais, divididos em cinco intervalos.

4. RESULTADOS

Um conjunto de 93 características descritivas das distribuições espacial e estatística da cromatina foram computadas para cada núcleo. Essas características foram arranjadas e processadas para gerar assinaturas individuais conforme descrito na seção 3.9. Os valores das assinaturas foram determinados em função de suas distâncias dos valores da população celular considerada normal.

Assinaturas nucleares

As assinaturas de núcleos individuais mostraram aumentos progressivos das distâncias em relação à população celular normal. A figura 15 exhibe exemplos de assinaturas de núcleos de diferentes categorias diagnósticas. O núcleo da célula glandular prostática normal apresentou uma distância média padronizada do normal de $z = 0,3868$, dois núcleos de uma NIP de baixo grau com valores $z = 0,8633$ e $z = 1,5625$. Os dois núcleos de lesões de alto grau apresentaram valores $z = 2,327$ e $z = 4,9231$. Tais núcleos constituem exemplos do espectro de assinaturas encontradas nas lesões estudadas. Já os núcleos de tecido aparentemente normal em próstatas com NIP de alto grau apresentaram perfis semelhantes aos dessas lesões, o que pode ser visto na figura 16. Foram evidenciadas mudanças significativas nas assinaturas nucleares de células aparentemente normais em NIP e carcinomas. Nas figuras 15 e 16 um limite de escala de 25 foi determinado para as ordenadas.

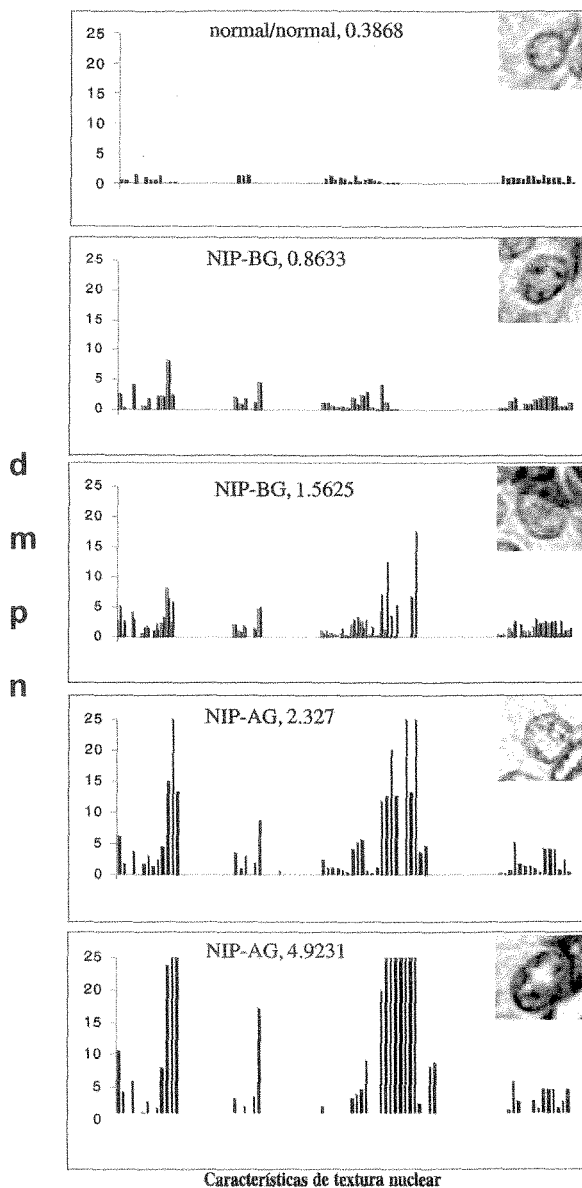


Figura 15. Assinaturas nucleares de núcleos individuais, representados no canto superior direito de cada histograma. Os valores das distâncias médias padronizadas da população celular normal (dmpn) para cada núcleo (valores z) estão à esquerda das imagens dos núcleos. A primeira assinatura corresponde a um núcleo da população normal. As duas assinaturas seguintes correspondem a núcleos de NIP de baixo grau e as duas últimas a NIP de alto grau.

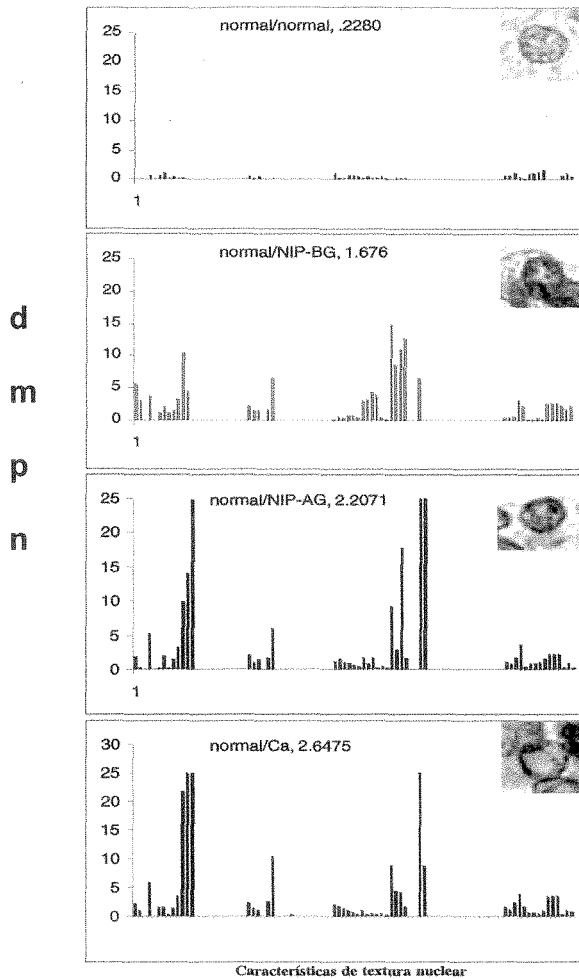


Figura 16. Assinaturas nucleares de núcleos individuais, representados no canto superior direito de cada histograma. Os valores das distâncias médias padronizadas da população celular normal (dmpn) para cada núcleo (valores z) estão à esquerda das imagens dos núcleos. A primeira assinatura corresponde a um núcleo normal. As duas assinaturas seguintes correspondem a núcleos de morfologia normal, mas próximos a NIP de baixo grau e alto grau, respectivamente. A última assinatura corresponde a um núcleo de aparência normal, mas oriundo de um espécime com carcinoma.

A distribuição das assinaturas de padrão histológico para os casos normais, lesões de baixo e alto grau e adenocarcinomas pode ser observada na figura 17. Como esperado, as assinaturas das NIP e dos adenocarcinomas foram similares. As assinaturas de núcleos celulares de aparência histológica normal em próstatas normais, com lesões intraepiteliais de baixo, alto grau e adenocarcinoma pode ser observada na figura 18. Os perfis mostrados nas figuras 17 e 18 incluem todos os núcleos celulares dos diferentes casos de cada categoria diagnóstica.

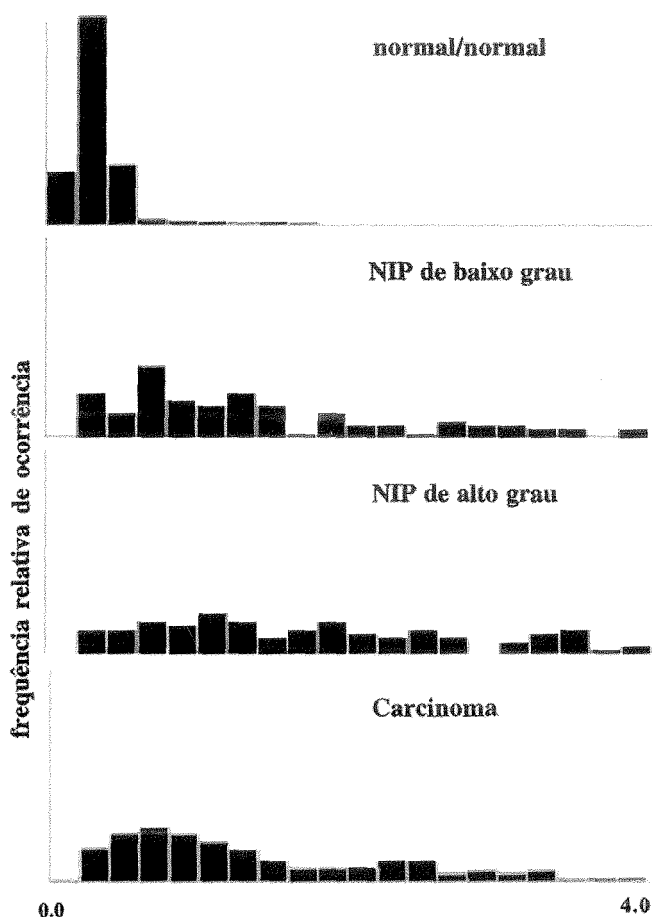


Figura 17. Assinaturas de padrão histológico para as categorias normal, NIP de baixo e alto graus e adenocarcinomas. O eixo das abcissas se estende por 4 desvios-padrão da média da população celular normal. Tais histogramas demonstram visualmente o padrão de distribuição (eixo y) e o grau de desvio dos núcleos celulares em relação à população celular normal (eixo x). Para melhor visualização da distribuição dos histogramas a escala de frequência relativa de ocorrência (FRO), apresentada no eixo das ordenadas foi limitada a 40%.

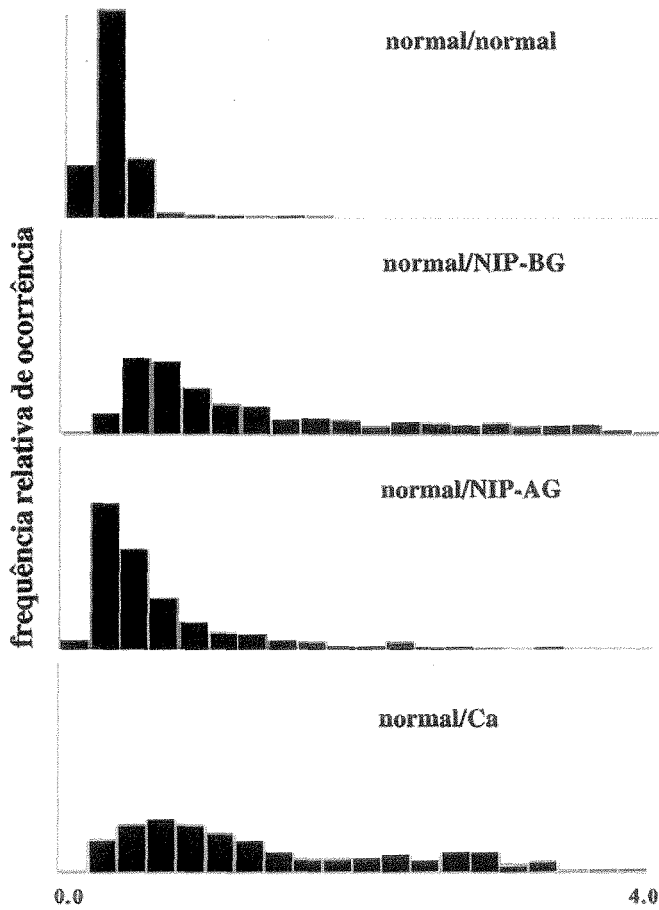


Figura 18. Assinaturas de padrão histológico compostas por glândulas de morfologia normal na proximidade de lesões de baixo grau (normal/NIP-BG), lesões de alto grau (NIP/AG) e adenocarcinomas (normal/Ca). O histograma da categoria normal (normal/normal) foi mantido para facilitar comparações entre as diferentes categorias diagnósticas. Para melhor visualização da distribuição dos histogramas a escala de frequência relativa de ocorrência (FRO), apresentada no eixo das ordenadas foi limitada a 40%.

Foi encontrada variabilidade considerável dentro da mesma categoria diagnóstica entre assinaturas de casos diferentes. Isso é evidenciado na figura 19, que apresenta cinco casos de próstatas normais com assinaturas relativamente homogêneas, principalmente quando comparados aos quatro casos de lesões intraepiteliais de alto grau da figura 20. A figura 21 mostra três assinaturas de padrão histológico de áreas com aparência histológica normal em casos de adenocarcinoma de próstata, mostrando uma assinatura similar a lesões de alto grau e carcinoma.

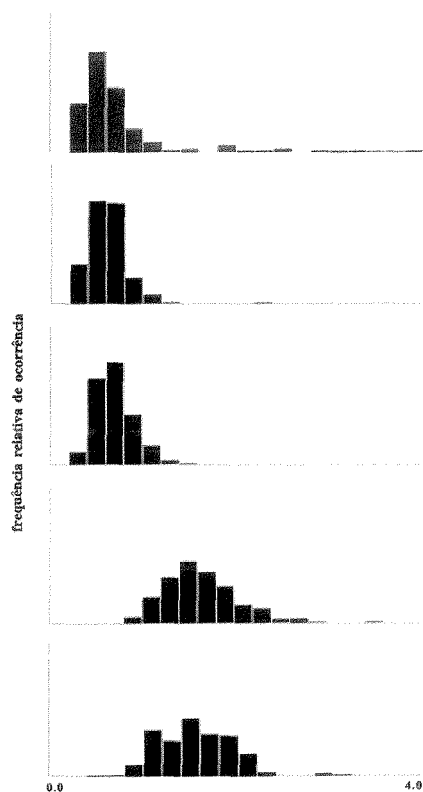


Figura 19. Assinaturas de padrão histológico de cinco casos de próstatas normais. Para melhor visualização da distribuição dos histogramas a escala da frequência relativa de ocorrência, apresentada nos eixo das ordenadas foi limitada a 30%.

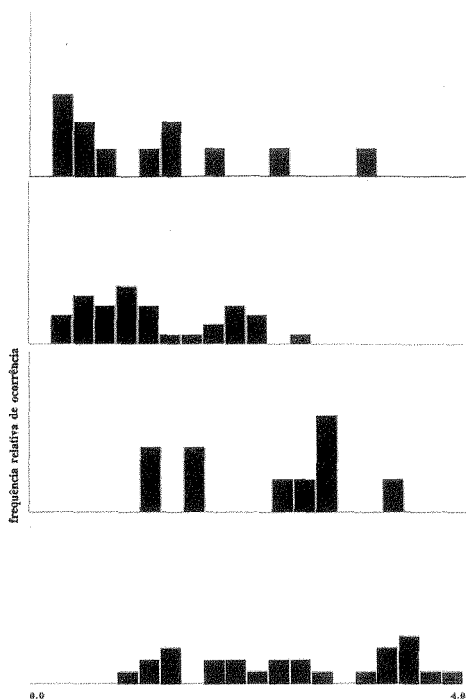


Figura 20. Assinaturas de padrão histológico de quatro casos de próstatas com lesões intraepiteliais de alto grau. Para melhor visualização da distribuição dos histogramas a escala de frequência relativa de ocorrência, apresentada no eixo das ordenadas foi limitada a 30% nas figuras 20 e 21.

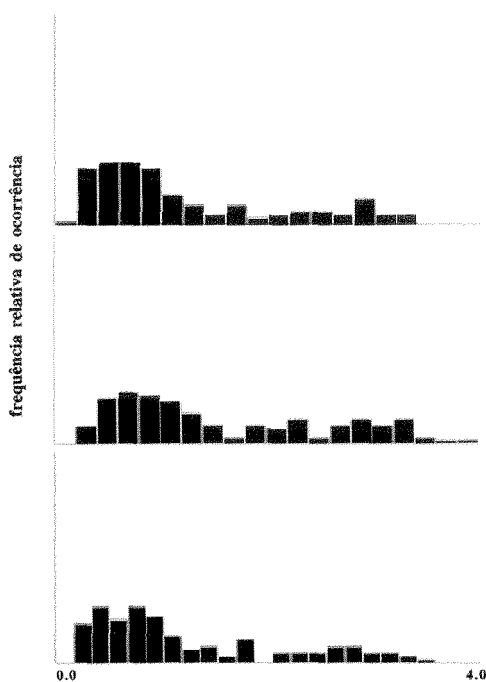


Figura 21. Três assinaturas de padrão histológico de áreas com aparência histológica normal em casos de adenocarcinoma de próstata.

Adenocarcinomas com invasão precoce

O primeiro passo na análise dos quatro casos de adenocarcinoma com invasão precoce foi a criação de dois conjuntos de dados, um com os 223 núcleos obtidos nas áreas de microinvasão (INV) e o outro com os núcleos presentes na NIP de alto grau (MED1, MED2, MED3 e DIST) relacionada com a área de microinvasão.

Várias características de textura nuclear foram claramente diferentes entre esses dois grupos, como pode ser observado na tabela III.

Tabela III. Características de textura nuclear das células da área de NIP de alto grau (NIP de alto grau) e da área de microinvasão. As definições e fórmulas para cálculo das características estão detalhadas no Apêndice.

Característica (n° no sistema TICAS)	Valores*	
	NIP alto grau	Microinvasão
Densidade óptica total (1)	0,2247	0,1796
Ênfase em seqüências longas (303)	7,06	6,27
Desuniformidade de comprimento de seqüência (306)	1,942	1,630
Homogeneidade de densidade óptica **(313)	0,2096	0,1797
Matriz de comprimento de seqüência **(272)	120,9	77,2
Matriz de comprimento de seqüência **(279)	14,15	7,7
Matriz de comprimento de seqüência **(282)	0,681	0,445
Matriz de comprimento de seqüência **(283)	0,102	0,104
Matriz de comprimento de seqüência **(284)	0,638	0,104

* Os valores estão expressos em unidades arbitrárias.

** Ver no Apêndice os detalhes de definição de cada característica.

As diferenças não são dramáticas, mas indicam uma tendência clara: os núcleos nas áreas de microinvasão apresentaram coloração menos acentuada e cromatina de textura mais fina, pois os valores para a matriz de comprimento de seqüência foram sistematicamente menores.

A figura 22 mostra a distribuição da densidade óptica total (DOT) para núcleos de células secretórias de próstatas normais, NIP de alto grau, áreas de microinvasão e adenocarcinomas utilizadas nesse estudo. Nenhum dos núcleos estudados tinha relação com células da camada basal reagentes com o anticorpo 34BetaE12. Pode-se observar que a distribuição da DOT nas áreas de microinvasão é menos ampla que nas áreas de NIP. As áreas de microinvasão mostram distribuições de DOT bimodais com coeficientes de variação menores em cada pico. Esse padrão pode ser igualmente observado na distribuição da DOT dos adenocarcinomas. A redução dos valores de densidade óptica total foi um achado interessante, pois contraria a expectativa de aumento de densidade óptica nas áreas próximas a focos de invasão. O pico unimodal dos núcleos de glândulas normais foi substituído por distribuições de base mais ampla nas NIP de baixo e alto graus e adenocarcinomas, onde as distribuições atingem valores com grande variabilidade desse parâmetro, sugerindo talvez possível correlação com o conteúdo de DNA.

A figura 23 mostra as assinaturas nucleares dos núcleos de NIP de alto grau e das regiões de microinvasão. O desvio da normalidade para os núcleos das áreas de microinvasão foi claramente menor quando comparado aos núcleos das áreas de NIP de alto grau. A assinatura nuclear das neoplasias intraepiteliais de alto grau mostrou várias características de textura nuclear com desvios substanciais em relação aos valores encontrados no epitélio glandular normal.

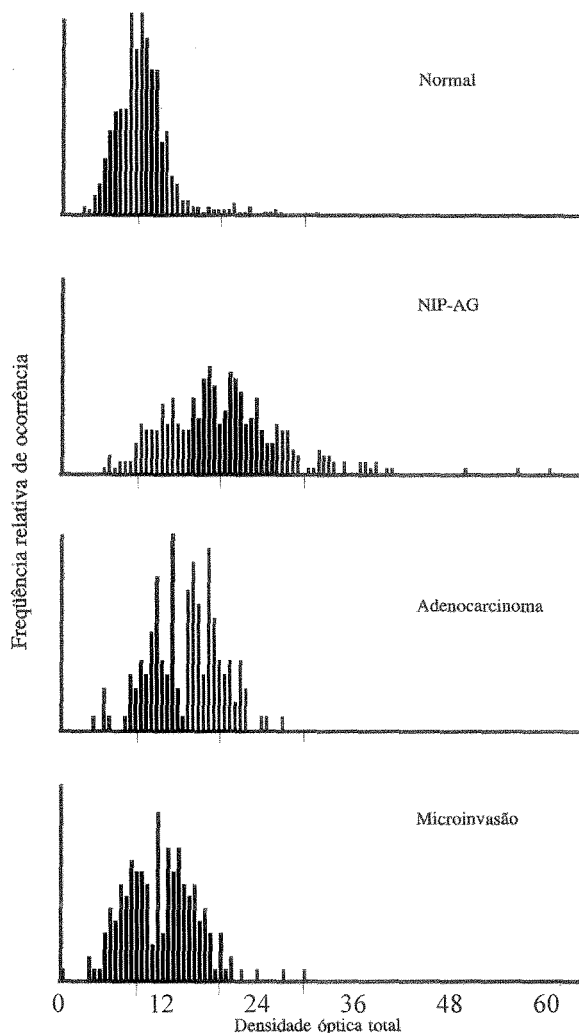


Figura 22. Distribuição da densidade óptica total dos núcleos celulares de casos normais, NIP de alto grau (NIP-AG), casos de adenocarcinoma e áreas de microinvasão. O eixo x se estende por 60 intervalos de valores de densidade óptica total que vão do zero (transparência) ao final do histograma (opacidade). O eixo y corresponde à frequência relativa de ocorrência de núcleos em cada intervalo de valor de densidade óptica.

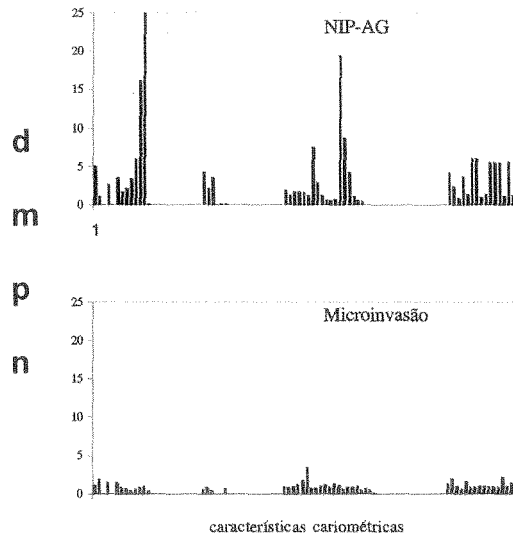


Figura 23. Assinaturas dos núcleos de todos os casos de NIP de alto grau (NIP-AG) e dos núcleos das quatro áreas de microinvasão estudadas (dmpn: distância média padronizada da população normal). A redução dos valores de dmpn na área de microinvasão com relação às áreas de lesão intraepitelial de alto grau (NIP-AG) é bastante pronunciada.

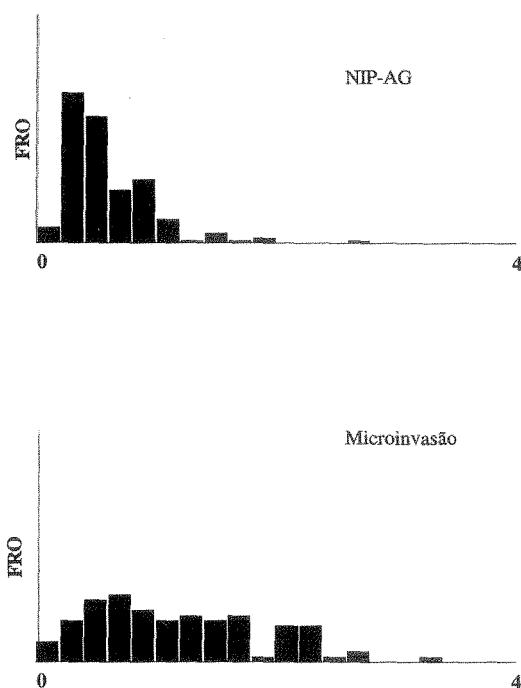


Figura 24. Assinaturas de padrão histológico para NIP de alto grau e áreas de microinvasão. Essas assinaturas apresentam a média entre todos os casos de cada categoria diagnóstica. Para melhor visualização da distribuição dos histogramas a escala de frequência relativa de ocorrência (FRO) apresentada no eixo das ordenadas foi limitada a 40%

A figura 24 apresenta as assinaturas de padrão histológico para todos os casos de NIP de alto grau e todas as áreas de microinvasão estudadas. Observa-se a presença de núcleos celulares a uma distância maior da população celular normal nas áreas de microinvasão quando comparadas aos casos de NIP-AG.

A diminuição da DOT nos núcleos da área de microinvasão em conjunto com as alterações de outras características descritivas da cromatina pode indicar a emergência de uma

subpopulação com densidades ópticas diferentes dos núcleos observados nas NIP de alto grau. O padrão bimodal nas áreas de microinvasão pode igualmente sugerir a emergência de um clone (183-186) de características de textura nuclear diferentes, mas com a capacidade de infiltrar, sendo o responsável pelo padrão observado em tais áreas. Para explorar tal hipótese, núcleos em diferentes áreas ao longo do epitélio glandular apresentando NIP de alto grau foram estudados (PROX, MED1, MED2, MED3 e DIST).

A figura 25 mostra a seqüência da média de assinaturas nucleares de núcleos celulares a diferentes distâncias das áreas de microinvasão. Fica evidente que as assinaturas mostraram uma tendência de atenuação à medida em que a amostragem se aproximava da área de microinvasão. Os dados apresentaram limitações ligadas a dois motivos principais: os limites de amostragem impostos por localizações estritas ao longo das glândulas e o número de casos estudados. Para aumentar a estabilidade dos conjuntos de dados e demonstrar a tendência de redução dos valores das características de textura nuclear nas áreas de microinvasão, foi decidido combinar os valores de três características adjacentes descritoras da matriz de comprimento de seqüência (282, 283 e 284). Eles representam comprimentos de seqüência de 7-8 a 11-12 elementos de imagem, todos no intervalo de densidade óptica de 0,6 a 0,9. Foi obtida a média aritmética entre todos os casos para cada um dos subconjuntos estudados e a figura 26 mostra este resultado. O valor correspondente ao adenocarcinoma foi acrescentado ao gráfico para fins de comparação. A textura de cromatina apresentou modificações significativas ao longo da glândula, atingindo seu valor mais baixo a 10-15 núcleos do ponto de microinvasão.

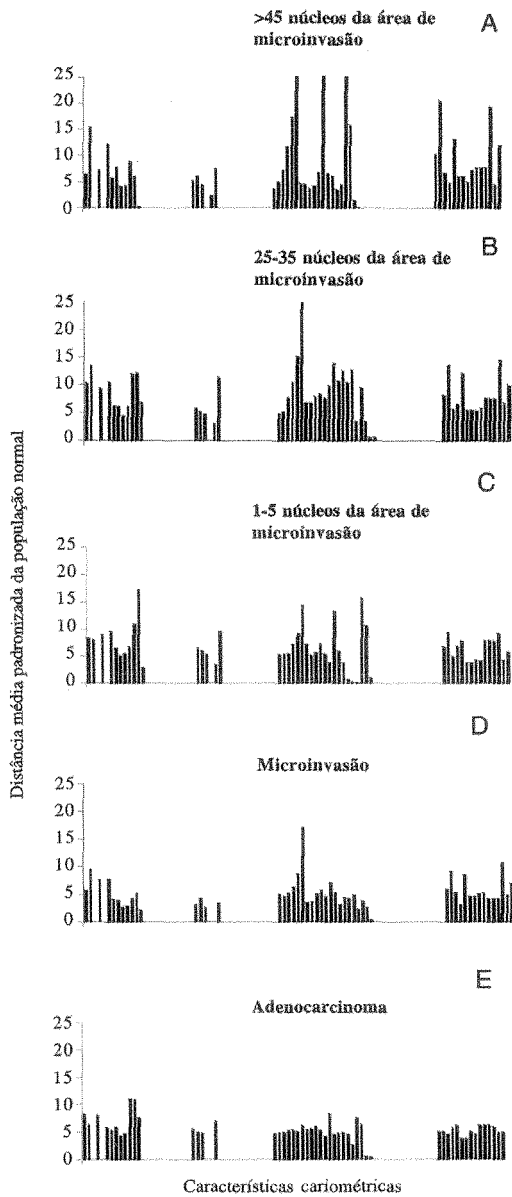


Figura 25. O histograma A exibe a assinatura para os núcleos de NIP-AG mais distantes da interface entre a área de microinvasão e a neoplasia intraepitelial de alto grau. O histograma B exibe as assinaturas para as áreas entre 25 e 35 núcleos da área de invasão (MED2). O histograma C mostra a assinatura dos núcleos celulares próximos da área de invasão (entre 1 e cinco núcleos da área de invasão: PROX). O histograma D mostra a assinatura na área de microinvasão (INV) e a assinatura dos adenocarcinomas é apresentada para comparação em E.

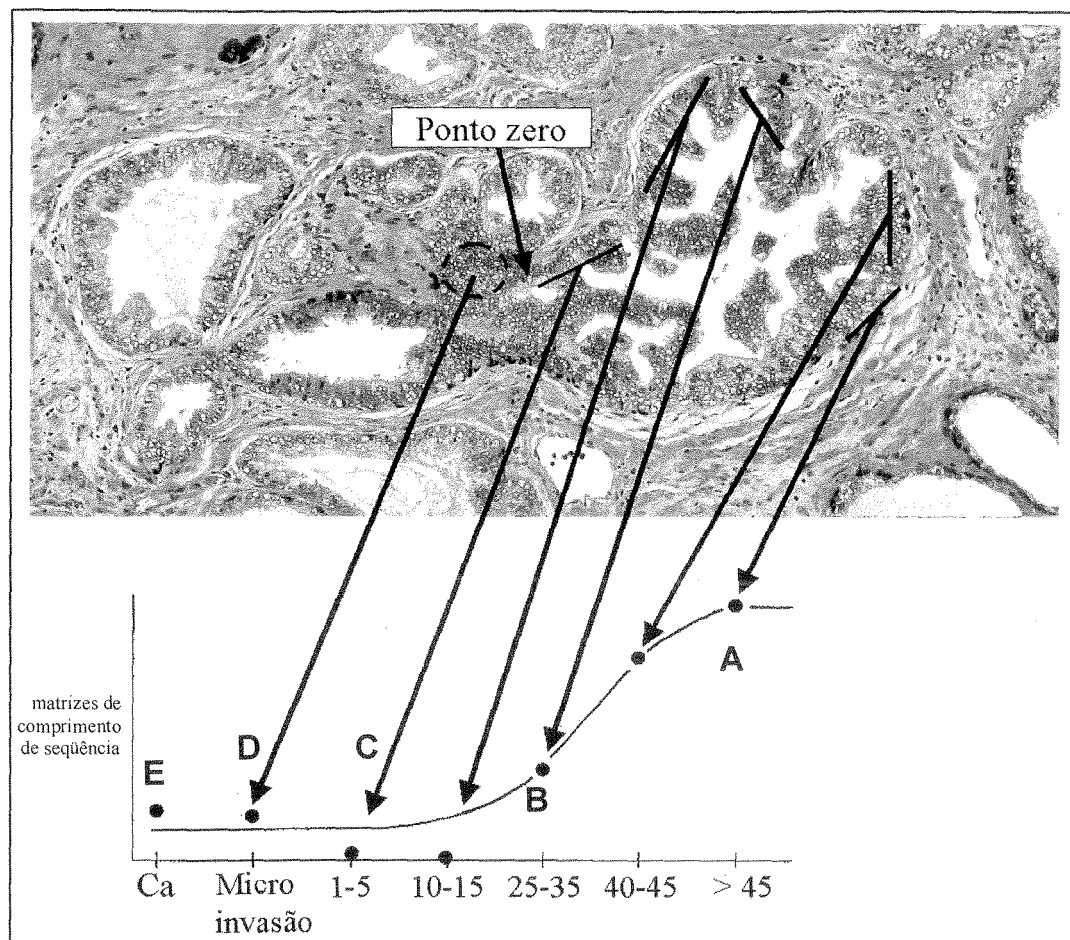


Figura 26. Glândula com área de microinvasão. O gráfico apresenta os valores médios das características 282, 283 e 284, componentes da matriz de comprimento de seqüência nos diferentes pontos mensurados dos quatro casos de adenocarcinoma com microinvasão. As letras do gráfico indicam as assinaturas nucleares correspondentes na figura 25. A figura mostrando uma lesão de alto grau com microinvasão foi incluída para ilustração, já que os valores apresentados representam a média entre todos os casos. O ponto E (adenocarcinoma invasor) não está ilustrado na fotomicrografia.

5. DISCUSSÃO

A assinatura nuclear constitui um perfil onde os valores expressos nas ordenadas podem ser interpretados como uma mensagem. As distâncias padronizadas para as características são uma seqüência ordenada de símbolos e possuem uma quantidade razoável de redundância. Isso permite o uso de características de textura nuclear que apresentariam apenas baixas razões de prevalência para agrupamento em uma determinada categoria diagnóstica quando utilizadas em esquemas de classificação. É notável que as assinaturas das lesões nos casos de próstatas normais obtidas por cistoprostatectomias sigam dois padrões, como pode ser visto na figura 20, onde três casos exibiram pequenos desvios do normal e dois apresentaram distâncias mais amplas. Pode ser questionada a “normalidade” histológica desses dois casos, sugerindo a possibilidade das assinaturas nucleares digitais identificarem achados morfológicos subvisuais de implicações possivelmente diagnósticas e prognósticas.

As tendências observadas nas assinaturas nucleares a partir das células normais até as lesões neoplásicas intraepiteliais de alto grau refletiram os resultados observados em outros trabalhos (40, 41), onde tais características foram utilizadas para classificar núcleos em diferentes categorias diagnósticas. Existiram, porém, diferenças relevantes de metodologia entre tais trabalhos e o presente estudo. A derivação de índices de progressão e regras de classificação é baseada na seleção de características que tem expressão regular nos núcleos de todas as categorias diagnósticas estudadas. Para tais propósitos, características que apresentem fortes tendências de limite central entre casos também devem ser escolhidas para delineamento da curva de progressão. Logo, os critérios de seleção de características em tais procedimentos favorecem todos os elementos que os casos e núcleos celulares

tenham em comum, em detrimento de características de especificidade suficiente para utilização como critérios de identificação. A seleção de características para identificação específica e individual de núcleos e lesões com o propósito de correlação entre tais diferenças, comportamentos biológicos específicos e prognósticos deve utilizar todas as características de textura nuclear disponíveis, e não apenas aquelas comuns a todos os grupos. São as diferenças de expressão de tais características, muitas vezes sutis, que podem conter as informações necessárias para a correta identificação de núcleos ou lesões. O pressuposto aqui apresentado é que essas diferenças sutis não se devam apenas a aleatoriedade e variações entre pacientes, mas também a diferenças genuínas entre os núcleos e lesões estudados.

Adenocarcinomas com invasão precoce

As áreas de microinvasão apresentaram reduções da densidade óptica total e dos valores da matriz de comprimento de seqüência em relação à população das áreas de neoplasias intraepiteliais de alto grau.

Redução da densidade óptica total

A coloração por hematoxilina e eosina não é estequiométrica ou específica para DNA, o que leva a coeficientes de variação maiores para a densidade óptica total do que os que seriam obtidos utilizando a coloração de Feulgen. Mas a densimetria de hematoxilina apresenta resultados reproduzíveis (133) quando empregada sob condições controladas, como neste estudo. Mesmo a microfotometria do DNA utilizando-se a reação de Feulgen apresenta um

número apreciável de restrições. Inexistem protocolos estabelecidos para tal reação, e o tempo de hidrólise do material, ou mesmo a fixação podem alterar os resultados da técnica(187). Além disso, procedimentos fundamentais para calibração de videofotômetro através de filtros de densidade neutra e o uso de fontes estabilizadas de alimentação não são aplicados em vários centros. Mesmo que esses aspectos venham a ser padronizados, a microfotometria de cortes histológicos ainda apresentará outros problemas relacionados a núcleos parcialmente seccionados, para os quais existem propostas de algoritmos como o de McCready(188), que assume que núcleos são esferas e que o DNA se distribui de maneira uniforme por todo núcleo, o que é suficiente para se concluir que tal algoritmo não soluciona a questão. Além disso, a lei de Lambert-Beer foi estabelecida para situações onde existe a distribuição homogênea de corante, o que não acontece no núcleo celular. Todas essas limitações sustentam a necessidade da utilização cautelosa dos valores de densidade óptica total como parâmetros na avaliação de núcleos celulares mesmo através de técnicas estequiométricas. As assinaturas nucleares digitais, ao oferecerem a avaliação integrada de vários parâmetros, muitos deles interrelacionados, podem reduzir o impacto de tais restrições.

Redução dos valores da matriz de comprimento de seqüência

A hipótese de maior sustentação na literatura para a alteração dos valores da matriz de comprimento de seqüência, cuja tradução morfológica é a textura mais fina da cromatina, pode ser o relaxamento estrutural da cromatina relacionado às alterações das histonas que ocorrem nos processos de transformação neoplásica(28). Como foi apresentado na introdução, a morfologia da célula é o produto de um sistema de interações complexas que

integra a matriz extracelular, o citoesqueleto e a matriz nuclear(189). A literatura começa a demonstrar que a expressão gênica altera e é também modificada ao interagir com a estrutura tridimensional das células(28). Sinais mecânicos(190) e químicos são transmitidos ao núcleo celular, resultando na alteração da organização tridimensional da cromatina(27, 191). E as vias de transdução desses sinais possivelmente modificam as histonas através de fosforilação e acetilação(192).

Instabilidade genética

Alterações morfométricas e densimétricas podem refletir as alterações cumulativas do genoma celular causadas pela instabilidade genética. E as alterações genéticas que determinam as neoplasias malignas podem ser agrupadas em pelo menos quatro categorias(193):

1. Alterações sutis de seqüência de pares de bases: são mutações que envolvem substituições, deleções ou inserções de alguns nucleotídeos. Essas alterações não são detectáveis pela análise citogenética. Um exemplo desse tipo de alteração são as mutações no gene *k-ras*, que ocorrem em 80% dos carcinomas de pâncreas(194).
2. Translocações cromossômicas: essas alterações podem ser detectadas pela análise citogenética como fusões de diferentes cromossomos ou entre segmentos normalmente não contíguos do mesmo cromossomo. A nível molecular essas translocações podem ocasionar a fusão entre dois gens diferentes, o que pode conferir propriedades tumorigênicas ao produto de transcrição. Um exemplo de translocação é o cromossomo Philadelphia das leucemias

mielógenas crônicas, onde o gene *c-abl* do cromossomo 9 fundiona-se ao gene *BCR* do cromossomo 22(195).

3. Alterações no número de cromossomos: tais alterações incluem o ganho e a perda de cromossomos, sendo encontradas em quase todos os principais tipos de neoplasias malignas sólidas humanas avançadas(196). Um exemplo é o ganho do cromossomo 7 no carcinoma renal(197).

4. Amplificações de genes: a nível molecular, as regiões de amplificação se caracterizam por múltiplas cópias de uma seqüência contendo um ou mais genes promotores de crescimento (*amplicon*). Os *amplicons* contém apenas entre 0,5 e 10 megabases de DNA, sendo diferentes das duplicações muito mais amplas dos cromossomos, como as vistas nas translocações e aneuploidia. (198). Um exemplo é a amplificação do gene N-myc que ocorre em 30% dos neuroblastomas avançados(199).

Os mecanismos determinantes da instabilidade genética permanecem desconhecidos. A hipótese dominante é de que mutações ainda desconhecidas determinariam a instabilidade genética e que algumas das mutações subsequentes levariam à progressão tumoral(200, 201). No entanto, apesar das investigações que se estendem por mais de duas décadas, a mutação inicial, capaz de determinar o processo de transformação tumoral ainda não foi demonstrada(200-203).

A aplicação das assinaturas digitais a núcleos em localizações selecionadas como áreas de microinvasão e suas vizinhanças foi realizada para explorar exatamente possíveis alterações de expressão fenotípica. Os resultados sugerem um processo em que determinado fenótipo

está envolvido com a microinvasão. Como já discutido, 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. Essa capacidade de caracterizar núcleos pode fornecer uma conexão entre a morfologia nuclear das lesões neoplásicas intraepiteliais e adenocarcinoma e a detecção de eventos moleculares por métodos da biologia molecular que permitem detecção em estágios ainda mais precoces. A hipótese de que as alterações do padrão de cromatina reflitam estágios na progressão e consequências de eventos moleculares iniciais deve ser explorada em maior profundidade. 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(185, 204) mas, ao mesmo tempo, altamente heterogênea, ou seja: policlonal com respeito aos cariótipos e fenótipos de células individuais(196, 205, 206), pelo surgimento de clones secundários na evolução da neoplasia.

Existe considerável evidência de que há redução na expressão de vários marcadores de diferenciação celular durante os estágios da NIP(174, 207-210). Outros marcadores tem expressão aumentada na NIP e adenocarcinoma(211-214). As alterações na expressão de biomarcadores estão claramente associadas com a progressão de alterações morfológicas nucleares ao longo das etapas da neoplasia intraepitelial prostática. Tal tendência não é claramente observada no adenocarcinoma, que parece expressar biomarcadores de forma aleatória(174). Nos adenocarcinomas o grau de anormalidade nuclear e a expressão protéica e de marcadores de diferenciação parecem associar-se de forma randômica.

Muito pouco se sabe sobre a seqüência de eventos a nível molecular durante a etapa de microinvasão. Uma expressão abrupta de alguns marcadores de diferenciação pode ocorrer em algumas áreas de microinvasão. Tal expressão pode ser interpretada como a emergência de um clone (183, 186) exibindo fenótipo invasivo. A diminuição da densidade óptica total e dos valores de matriz de comprimento de seqüência, tal como observado nesse estudo, pode refletir indiretamente tal evento.

Esse estudo foi desenhado basicamente para desenvolvimento e demonstração de viabilidade do método. Projetos mais amplos utilizando número maior de casos serão necessários, sendo particularmente interessante a aplicação conjugada de microdissecção a laser(215, 216) e métodos de biologia molecular(217).

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 ou citológico fixado em formalina neutra ou álcool sem implicar em modificação de técnicas de processamento e coloração ou destruição de material.

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 à malignidade. Para tal procedimento será fundamental a derivação de uma medida de certeza de que um núcleo de fato representa

claramente um processo patológico e o desenvolvimento de métodos que permitam aferir o quanto cada característica cariométrica contribui para a medida de certeza final. Dentre as alternativas possíveis para exploração das informações das assinaturas nucleares estão os sistemas especialistas.

Outra aplicação possível das assinaturas digitais é no desenvolvimento de um biomarcador substituto (*SEBM*, ou *surrogate endpoint biomarker*)(218, 219). Para isso, dois aspectos são fundamentais: determinar as propriedades que tal biomarcador deve possuir e qual a etapa do processo de progressão oncogênica esse marcador deve monitorar. Um biomarcador efetivo deve permitir uma detecção sensível e precisa da progressão tumoral. Isso implica em uma entidade mensurável, que permita o desenvolvimento de escalas numéricas. Ao mesmo tempo, o procedimento de amostragem deve ser minimamente invasivo e permitir repetidas avaliações.

O índice de progressão deve representar características reversíveis, de forma que não apenas a progressão, mas a estabilização e a regressão de lesões possam ser também demonstradas. Tal índice deve também refletir mudanças em intervalos curtos de tempo. Alterações como a ruptura da camada basal, estratificação de camadas epiteliais ou o padrão de vascularização nas cercanias de neoplasias intraepiteliais prostáticas podem levar meses para refletir alterações regressivas, enquanto alterações de textura da cromatina podem ser verificadas em intervalos muito menores de tempo. Infelizmente existem até agora muito poucos estudos de análise de imagem que avaliem material de ensaios de quimioprevenção. Um estudo preliminar sobre a eficácia da vitamina A e DFMO (difluormetilornitina) em lesões de ceratose actínica está em fase de conclusão(165). Esse estudo demonstrou que existe uma curva de progressão a partir da pele normal até lesões severas. Foi também

demonstrada a capacidade do DFMO (220) em promover a regressão de lesões(221, 222). A mesma curva de progressão foi aplicada à vitamina A, demonstrando também sua eficácia como agente quimiopreventivo.

Usos das assinaturas digitais em Pneumologia

Como já frisado anteriormente, o método das assinaturas digitais não impõe restrições ou modificações de qualquer método de investigação em pneumologia que demande a colheita de material para estudo pela citopatologia ou anatomia patológica. Como já apresentado no item 1.3, métodos de morfometria e análise de imagem tem sido aplicados na pesquisa em patologia pulmonar desde o final década de 70. De particular interesse foi a avaliação do conteúdo do DNA em amostras de escarro com células metaplásicas coradas pela reação de Feulgen(47). A metaplasia escamosa típica apresentou somente populações celulares com histogramas de distribuição diplóide. Populações celulares metaplásicas com atipia discreta apresentaram histogramas com distribuição predominantemente diplóide e alguns valores tetraplóides. Já os histogramas das metaplasias com atipia moderada apresentaram predomínio de núcleos tetraplóides, com alguns núcleos atingindo valores hipertetraplóides. Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos(223). Tais observações sugerem alterações sequenciais do DNA em lesões precursoras do carcinoma epidermóide do pulmão(224) documentáveis por análise de imagem. A evolução dos sistemas de análise de imagem computadorizada tornou possível a mensuração de centenas de características morfométricas e densimétricas dos núcleos celulares em frações de segundo até mesmo em computadores do tipo IBM-PC contemporâneos.

O conceito de alterações subvisuais de textura da cromatina associadas com malignidade (MAC ou *malignancy associated changes*)(225) já foi aplicado a biópsias pulmonares de aparência histológica normal provenientes de pacientes com carcinomas pulmonares através de análise de imagem computadorizada. Nessa investigação preliminar, 80% das biópsias foram corretamente identificadas como provenientes de pacientes portadores de neoplasias malignas do pulmão(51). Estudos recentes sugerem o uso do estudo da textura de cromatina em amostras de escarro como alternativa para aumentar a sensibilidade desse método não-invasivo (226). No entanto, os dois estudos citados utilizaram corantes com propriedades estequiométricas, que apresentam severas limitações para a avaliação visual realizada pelo patologista. O uso das assinaturas nucleares e de padrão histológico baseadas em colorações como Papanicolaou e hematoxilina e eosina poderão simplificar a metodologia de estudo da textura de cromatina em núcleos celulares de amostras de escarro, lavados e escovados brônquicos, lavados bronco-alveolares e biópsias do pulmão, mediastino e pleura.

As possibilidades de exploração das assinaturas digitais em pneumologia são reforçadas por estudos que propõem a detecção precoce de carcinomas pulmonares por métodos de biologia molecular. Um recente trabalho aplicando quatro diferentes métodos para detecção de mutações e instabilidade em microsátélites em amostras de lavado broncoalveolar de 43 pacientes cujo tumor primário apresentasse pelo menos um marcador molecular estudado atingiu 53% de sensibilidade total(227). É relevante que o mesmo estudo sugira as possibilidades de uso da análise de imagem no aumento da taxa de detecção de técnicas citológicas(228).

O recente trabalho de Brunstein(229), demonstrou aumento de duas vezes da sensibilidade no diagnóstico de neoplasia maligna pulmonar ao combinar as técnicas de citologia convencional pela técnica de Papanicolaou (sensibilidade de 27,5%) e detecção da proteína p53 por imunocitoquímica (sensibilidade de 34,2%) aplicadas a lavados brônquicos. A sensibilidade dos dois métodos combinados foi de 55,9%. É necessário avaliar a sensibilidade da associação desses métodos com as assinaturas nucleares digitais.

6. CONCLUSÕES

Ao final do estudo conclui-se que:

- a. A visualização de parâmetros de textura de cromatina expressos em unidades de distância (ou desvio) em relação à população celular normal (distância média padronizada da população celular normal) permite caracterizar núcleos celulares de forma específica através de assinaturas nucleares digitais individuais.
- b. As assinaturas de padrão histológico, derivadas dos valores das assinaturas nucleares individuais, permitem a caracterização de populações celulares de áreas de interesse através do grau de desvio dos núcleos celulares dessas em relação à população celular normal.
- c. A aplicação desse método a neoplasias intraepiteliais prostáticas de baixo e alto grau e adenocarcinomas avançados ou em etapa de invasão precoce permitiu a identificação de alterações da textura de cromatina em regiões vizinhas com aparência histológica normal.

APÊNDICE

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.

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

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.

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

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(230):

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

$$\text{Ext Sum} = \sum_{\substack{I=0 \\ (i,j)}}^{mx \quad my} \sum_{\substack{j=0 \\ \text{in } N}} I[i][j]$$

A = Área

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

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

$10^{(-i/100)} = 1.0$ for $i = 0$ preto

0.016 for $i = 180$ – cor de fundo

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 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 $\{2, 4, 6, 8, 10, 12\}$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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: 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:

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

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: $h_2 = 1 - h_1$

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

a seguir, o valor cl deve ser definido:

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

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 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*):

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

O valor médio é definido como:

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

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 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
```

```
}
```

End

GLOSSÁRIO

Cariometria: conjunto de mensurações realizadas em núcleos celulares.

Ciência da informação: ramo multidisciplinar que estuda a informação definida como o produto de procedimentos que possuem a capacidade de organizar dados, como seleção, indexação e sumarização, dentre outros(34).

Estrutura de dados(139): é um tipo de informação cujos valores podem ser decompostos em um conjunto de elementos que podem ser atômicos (ou indecomponíveis) ou novas estruturas de dados e inclui um conjunto de associações ou relações (estrutura) que envolve os componentes. A estrutura de dados define dados, estruturas e elementos atômicos da seguinte maneira:

Dado é a informação ou fato usado como base para raciocínio, discussão ou computação.

Estrutura: arranjo ou relações entre elementos em um sistema, corpo ou substância.

Elemento atômico: o elemento atômico é todo aquele considerado, para fins de análise de dados, como único e não passível de decomposição. Observando um tecido com uma lupa, a célula é um elemento atômico. Em magnificações intermediárias, a polaridade celular em tecidos epiteliais pode ser avaliada pelas relações entre núcleo e citoplasma celulares, que podem então ser considerados elementos atômicos. Em grande aumento, todas as organelas celulares visíveis podem ser consideradas elementos atômicos.

Gratícula: retículo constituído por um conjunto de linhas gravadas em um vidro transparente e que pode ser aplicado sobre as lentes oculares de um microscópio.

Imagético: procedimento que envolve imagens(231)

Método de Monocamada: todo o método de preparação de espécimes citológicos que tem o objetivo de obter a distribuição uniforme de células em camada única, evitando sobreposições.

Microfotômetro: instrumento usado para medir a energia de um feixe luminoso, e que se pode basear em avaliações efetuadas visualmente ou em comparações quantitativas realizadas por meio de dispositivos fotoelétricos, adaptado para uso em microscópios.

Morfometria: mensurações relacionadas à morfologia, seja a nível celular, quando recebe o nome de citometria como tecidual, quando tem o nome de histometria ou histomorfometria.

Pós-tradução: alterações que ocorrem após a formação de ligações peptídicas. A glicosilação, acetilação e fosforilação são alguns exemplos de alteração protéica pós-tradução.

Raciocínio baseado em casos (*case based reasoning*): é o método em que casos anteriores são utilizados para solucionar uma nova situação de características semelhantes(232).

Redes inferenciais (*inference engine*): parte do sistema especialista capaz de delinear novas inferências a partir de bancos de dados(177).

Sistemas especialistas: são sistemas que oferecem diagnósticos e/ou recomendações baseadas na representação do conhecimento de experiências reais(177).

Transmitância: num sistema que recebe energia radiante, fração dessa energia que é transmitida pelo sistema (Física)(231).

Videomicroscopia digital: tecnologia que integra videocâmaras e dispositivos semelhantes, microscópios ópticos e computadores(233)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nickerson JA, Blencowe BJ, Penman S. The architectural organization of nuclear metabolism. *Intl Rev Cytol* 1995;162A:67-123.
2. Berezney R, Mortillaro MJ, Ma H, Wei X, Samarabandu J. The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol* 1995;162A:1-65.
3. Fawcett DW. An atlas of fine structure: the cell, its organelles, and inclusions. Philadelphia,: W. B. Saunders Co.; 1966.
4. He DC, Nickerson JA, Penman S. Core filaments of the nuclear matrix. *J Cell Biol* 1990;110(3):569-80.
5. Belgrader P, Siegel AJ, Berezney R. A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix. *J Cell Sci* 1991;98(Pt 3):281-91.
6. Sun JM, Chen HY, Davie JR. Nuclear factor 1 is a component of the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 1994;55(2):252-63.
7. Bernhard W, Granboulan N. The fine structure of the cancer cell nucleus. *Exp Cell Res* 1963;9(suppl.):19-53.
8. Smetana K, Lejnar J, Vlastiborova A, Busch H. On interchromatinic dense granules of mature human neutrophil granulocytes. *Exp Cell Res* 1971;64(1):105-12.
9. Berezney R. Dynamic properties of the nuclear matrix. In: Busch H, editor. *The cell nucleus*. New York: Academic Press; 1979. p. 713.
10. Davie JR. The nuclear matrix and the regulation of chromatin organization and function. *Int Rev Cytol* 1995:191-250.

11. Getzenberg RH, Pienta KJ, Ward WS, Coffey DS. Nuclear structure and the three-dimensional organization of DNA. *J Cell Biochem* 1991;47(4):289-99.
12. de Jong L, Grande MA, Mattern KA, Schul W, van Driel R. Nuclear domains involved in RNA synthesis, RNA processing, and replication. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996;6(2-3):215-46.
13. Schul W, de Jong L, van Driel R. Nuclear neighbours: the spatial and functional organization of genes and nuclear domains. *J Cell Biochem* 1998;70(2):159-71.
14. Pienta KJ, Getzenberg RH, Coffey DS. Cell structure and DNA organization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1991;1(4):355-85.
15. Fakan S, Bernhard W. Nuclear labelling after prolonged ³H-uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography. *Exp Cell Res* 1973;79(2):431-44.
16. Nash RE, Puvion E, Bernhard W. Perichromatin fibrils as components of rapidly labeled extranucleolar RNA. *J Ultrastruct Res* 1975;53(3):395-405.
17. Fakan S, Puvion E, Sphor G. Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolate rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 1976;99(1):155-64.
18. Fey EG, Penman S. Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(1):121-5.
19. Stuurman N, Van Driel R, De Jong L, Meijne AM, Van Renswoude J. The protein composition of the nuclear matrix of murine P19 embryonal carcinoma cells is differentiation-stage dependent. *Exp Cell Res* 1989;180(2):460-6.
20. Stuurman N, Meijne AM, van der Pol AJ, de Jong L, van Driel R, van Renswoude J. The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *J Biol Chem* 1990;265(10):5460-5.

21. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Bone cell differentiation: a functionally coupled relationship between expression of cell-growth- and tissue-specific genes. *Curr Opin Cell Biol* 1990;2(6):1018-27.
22. Paul JI, Schwarzbauer JE, Tamkun JW, Hynes RO. Cell-type-specific fibronectin subunits generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 1986;261(26):12258-65.
23. Latchman DS. Cell-type-specific splicing factors and the regulation of alternative RNA splicing. *New Biol* 1990;2(4):297-303.
24. Berezney R, Coffey DS. Nuclear matrix: isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J Cell Biol* 1977;73:616-637.
25. Kamel HM, Kirk J, Toner PG. Ultrastructural pathology of the nucleus. *Curr Top Pathol* 1990;82:17-89.
26. Underwood JC. Nuclear morphology and grading in tumours. *Curr Top Pathol* 1990;82:1-15.
27. 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.
28. 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.
29. Partin AW, Getzenberg RH, CarMichael MJ, Vindivich D, Yoo J, Epstein JI, et al. Nuclear matrix protein patterns in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer Res* 1993;53(4):744-6.
30. Pienta KJ, Lehr JE. A common set of nuclear matrix proteins in prostate cancer cells. *Prostate* 1993;23(1):61-7.

31. Khanuja PS, Lehr JE, Soule HD, Gehani SK, Noto AC, Choudhury S, et al. Nuclear matrix proteins in normal and breast cancer cells. *Cancer Res* 1993;53(14):3394-8.
32. Keesee SK, Meneghini MD, Szaro RP, Wu YJ. Nuclear matrix proteins in human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(5):1913-6.
33. Keesee SK, Marchese J, Meneses A, Potz D, Garcia-Cuellar C, Szaro RP, et al. Human cervical cancer-associated nuclear matrix proteins [In Process Citation]. *Exp Cell Res* 1998;244(1):14-25.
34. Stonier T. Introduction. In: Stonier T, editor. *Information and meaning: an evolutionary perspective*. New York: Springer; 1997. p. 1-9.
35. Bartels PH. Quantitation in histopathology: Objectives, origins, digital image analysis and unresolved issues. In: Marchevsky AM, Bartels PH, editors. *Image analysis: a primer for pathologists*. New York: Raven Press; 1994. p. 1-28.
36. Leeuwenhoek A. Microscopical considerations concerning blood etc. *Phil trans* 1674;9:121.
37. Reagan JW, Moore RD. Morphology of the malignant squamous cell: A study of six thousand cells derived from squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Am J Path* 1952;28:105-127.
38. Bibbo M, Bartels PH, Dytch HE, Wied GL. Cell image analysis. In: Bibbo M, editor. *Comprehensive cytopathology*. Philadelphia: Saunders; 1991. p. 965-983.
39. Palcic B, MacAulay C. Malignancy associated changes: Can they be employed clinically? In: Wied G, Bartels P, Rosenthal D, Schenck U, editors. *Compendium on the computerized cytology and histology laboratory*. Chicago: TOC; 1994. p. 157-165.
40. Bartels PH, Montironi R, Hamilton PH, Thompson D, Vaught L, Bartels HG. Nuclear chromatin texture in prostatic lesions I. PIN and Adenocarcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20:389-396.

41. Bartels PH, Montironi R, Hamilton PH, Thompson D, Vaught L, Bartels HG. Nuclear chromatin texture in prostatic lesions II. PIN and malignancy associated changes. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20:397-406.
42. 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):407-416.
43. 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* 1998;In press.
44. Bibbo M, Bartels PH, Galera-Davidson H, Dytch HE, Wied GL. Markers for malignancy in the nuclear texture of histologically normal tissue from patients with thyroid tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 1986;8(2):168-76.
45. Montag AG, Bartels PH, Lerma-Puertas E, Dytch HE, Leelakusolvong S, Bibbo M. Karyometric marker features in tissue adjacent to in situ cervical carcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11(4):275-80.
46. Bibbo M, Michelassi F, Bartels PH, Dytch H, Bania C, Lerma E, et al. Karyometric marker features in normal-appearing glands adjacent to human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1990;50(1):147-51.
47. Nasiell M, Kato H, Auer G, Zetterberg A, Roger V, Karlen L. Cytomorphological grading and Feulgen DNA-analysis of metaplastic and neoplastic bronchial cells. *Cancer* 1978;41(4):1511-21.
48. Burns TR, Underwood RD, Greenberg SD, Teasdale TA, Cartwright J, Jr. Cytomorphometry of large cell carcinoma of the lung. *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11(1):48-52.

49. Saito Y, Imai T, Nagamoto N, Sato M, Ota S, Kanma K, et al. A quantitative cytologic study of sputum in early squamous cell bronchogenic carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1988;10(5):365-70.
50. Greenberg SD, Hunter NR, Taylor GR, Swank PR, Winkler DG, Spjut HJ, et al. Application of cell-image analysis to the diagnosis of cellular atypias in sputum: a review. *Diagn Cytopathol* 1986;2(2):168-74.
51. MacAulay C, Lam S, Payne P, LeRiche JC, Palcic B. Malignancy-associated changes in bronchial epithelial cells in biopsy specimens. *Anal Quant Cytol Histol* 1995;17:55-61.
52. Ikeda N, MacAulay C, Lam S, LeRiche J, Payne P, Garner D, et al. Malignancy associated changes in bronchial epithelial cells and clinical application as a biomarker. *Lung Cancer* 1998;19(3):161-6.
53. Lam S, Shibuya H. Early diagnosis of lung cancer [In Process Citation]. *Clin Chest Med* 1999;20(1):53-61, x.
54. Bozzo PD, Vaught LC, Alberts DS, Thompson D, Bartels PH. Nuclear morphometry in solar keratosis. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20(1):21-8.
55. Ostle B, Mensing RW. *Statistics in research*. 3 ed. Iowa: Iowa State University Press; 1975.
56. Hicks CR. *Fundamental concepts in the design of experiments*. New York: Holt, Rinehart, Winston; 1973.
57. Weibel ER. Stereological methods. In: Weibel ER, editor. *Stereological methods: practical methods for biological morphometry*. New York: Academic Press; 1980.
58. Baak JPA, Oort J. The case for quantitative pathology in cancer diagnosis and treatment. In: Baak JPA, editor. *Quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis*. Berlin: Springer Verlag; 1991. p. 7-18.

59. Weibel ER, Elias H, International Society for Stereology. Introduction to stereology and morphometry. In: Weibel ER, Elias H, editors. Quantitative methods in morphology. Quantitative Methoden in der Morphologie; proceedings. Berlin, New York,: Springer-Verlag; 1967. p. 3-19.
60. Gundersen HJG, 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;96:379-394.
61. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological Research and diagnosis. APMIS 1988(96):857-881.
62. Baak J, Oort J. Morphometry in diagnostic pathology. Berlin: Springer-Verlag; 1983.
63. Baak J. Basic points in and practical aspects of application of diagnostic morphometry. Pathol Res Pract 1983;179:193-199.
64. Baak J, Noteboom E, Koevoets J. The influence of fixatives and other variations in tissue processing on nuclear morphometric features. Anal Quant Cytol Histol 1989;11:219-224.
65. Collan Y, Torkkeli T, Kosma V, Pesonen E, Kosunen O, Jantunen E, et al. Sampling in diagnostic morphometry. Pathol Res Pract 1987;182:401-406.
66. van Diest P, Smeulders A, Thunnissen F, Baak J. Cytomorphometry. A methodologic study of preparation techniques, selection methods and sample sizes. Anal Quant Cytol Histol 1989;11:225-231.
67. Buffon G. Essai d'arithmetique morale. Suppl a l'Histoire Naturelle. Paris; 1777.
68. Schreibers C. Beytraege zur Geschichte und Kenntnis meteoritischer Steine und Metallmassen. Viena, Áustria; 1820.

69. Delesse A. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *Ann Mines* (IV) 1848;13:379.
70. Chalkley HM. Method for quantitative morphological analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst* 1943;4:47.
71. Feulgen R, Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende Elektiv Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *ZPhysiol Chem* 1924;135:203-248.
72. Erler BS, Marchevsky AM. Microphotometry in Pathology. In: Marchevsky AM, Bartels PH, editors. *Image analysis: a primer for pathologists*. New York: Raven Press; 1994. p. 181-206.
73. Bunsen RW, Roscoe HE. Photochemische Untersuchungen. *Poggendorf's Annalen* 1862;1(17):529.
74. Sorby HC. On a definite method of qualitative analysis of animal and vegetable colouring matters by means of the spectrum microscope. *Proc R Soc Lond* 1867;15:433-455.
75. Abbe E. Ueber einen Spektralapparat am Mikroskop. *Jena Z Med Natur* 1870;5:459-470.
76. Kohler A. Ein neues Beleuchtungsverfahren fuer mikrographische Zwecke. *Z wiss Mikroskopie* 1893;10:433-440.
77. Köhler A. Mikrographische Untersuchungen mit ultravioletem Licht. *Z wiss Mikroskopie* 1904;21:129-165, 272-304.
78. Vles F. *Proprietes optiques des muscles*. Paris: Hermann; 1911.
79. Lucas FF. Late developments in microscopy. *J Franklin Inst* 1934;217:661-707.

80. Lucas FF. The architecture of living cells recent advances in methods of biological research- optical sectioning with the ultraviolet microscope. *Proc Natl Acad Sci US* 1930;16:599-607.
81. Caspersson T. I. Zur Kenntnis der Optik weisser Sole. Theoretische Ableitung des Absorptionskoeffizienten. *Kolloid Z* 1932;60:151-159.
82. Caspersson T. II. Die diffuse Seitenstrahlung. *Kolloid Z* 1933;65:162-170.
83. Caspersson T. III. Die optischen Verhaeltnisse bei der Koagulation. *Kolloid Z* 1933;65:301-307.
84. Caspersson T. Ueber den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkerns. *Scand Arch Physiol* 1936;(Suppl. 8)(73-151).
85. Caspersson T. Ueber die Rolle der Desoxyribosenukleinsaeure bei der Zellteilung. *Chromosoma* 1939;1(147-156).
86. Caspersson T. *T. Cell growth and cell function*. New York: W.W. Norton; 1950.
87. Mainland D. Colorimetric tests of nuclear staining. *Stain Technol* 1933;8:69-72.
88. Pollister AW, Ris H. Nucleoprotein determinations in cytological preparations. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol* 1948;12:147-157.
89. Ris H. The composition of chromosomes during mitosis and meiosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol* 1948;12:158-160.
90. Swift H. The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. *Physiol Zool* 1950;23:169-198.
91. Bartels PH, Da Silva VD. Image Analysis. In: Koss LG, editor. *Diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; in press. p. 2 v.
92. Patau K. Absorption microphotometry of irregular-shaped objects. *Chromosoma* 1952;5:341-362.

93. Ornstein L. The distributional error in microspectrophotometry. *Lab Invest* 1952;1:250-262.
94. Atkin NB, Richards BM. Deoxyribonucleic acid in human tumors as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain. *Br J Cancer* 1956;10:769-786.
95. Richards BM, Atkin NB. DNA content of human tumors; change in uterine tumors during radiotherapy and their response to treatment. *Br J Cancer* 1959;13:788-800.
96. Inoué S, Spring KR. Glossary. In: Inoué S, Spring KR, editors. *Video Microscopy*. New York: Plenum Press; 1997. p. 664.
97. Serra JP. *Image analysis and mathematical morphology*. London ; New York: Academic Press; 1982.
98. Castleman KR. *Digital image processing*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall; 1996.
99. Russ JC. *The image processing handbook*. 2nd ed. New York: Springer; 1995.
100. Rasband W. Scion Image Beta2 version (online). In: <http://www.scioncorp.com> ed: National Institutes of Health, modified by Scion Corporation. Frederick, MD, USA; 1997.
101. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd ed. New York: W.H. Freeman; 1995.
102. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 3rd ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1996.
103. Duda RO, Hart PE. *Pattern classification and scene analysis*. New York,: Wiley; 1973.
104. Simon H, Kunze KD, Voss K. *Automatische Bildverarbeitung in der Medizin und Biologie*. Dresden: Steinkopff Verlag; 1975.
105. Bartels PH, Olson GB. Computer analysis of lymphocyte images. In: Catsimpoolas N, editor. *Methods of Cell Separation*. New York: Plenum Press; 1980. p. 1-99.
106. Hand DJ. *Discrimination and classification*. Chichester [Eng.] ; New York: Wiley; 1981.

107. Clifford HT, Stephenson W. An introduction to numerical classification. New York: Academic Press; 1975.
108. Weiss SM, Kulikowski CA. Computer systems that learn : classification and prediction methods from statistics, neural nets, machine learning, and expert systems. San Mateo, Calif.: M. Kaufmann Publishers; 1991.
109. Breiman L. Classification and regression trees. Belmont, Calif.: Wadsworth International Group; 1984.
110. Bartels PH, Bartels HG. Classification strategies. In: Duffy FH, editor. Topographic mapping of brain electrical activity. Boston: Butterworth; 1986. p. xv, 428 , [16] of plates.
111. Dickmanns E. Recent developments in dynamic machine vision at Universität der Bundeswehr München (online)
<http://www.ai.mit.edu/events/brainsMachines/abstracts/F1998/ernst.html>. In: Massachusetts Institute of Technology; 1998.
112. Bartels PH, Bibbo M, Graham AR, Paplanus S, Shoemaker RL, Thompson D. Image understanding system for histopathology. *Anal Cell Pathol* 1989;1:195-214.
113. Bartels PH, Weber JE, Thompson D, Hamilton PW, Montironi R. Expert Systems for Histopathology. In: Hamilton PW, Allen DC, editors. *Quantitative Clinical Pathology*. London: Blackwell; 1995. p. 273-288.
114. Bartels PH, Thompson D, Gahm T. Automated microscopy in diagnostic histopathology: From image processing to automated reasoning. *Int J Imaging Systems Technol* 1997;8:214-223.
115. Preston K. The CELLSCAN system: A leukocyte pattern analyzer. In: *Proc Western Joint Comput Conference*; 1961; 1961. p. 173.

116. Golay MJE, inventor Apparatus for counting binucleate lymphocytes in blood. Pat No. 3,214,574,1965. US. 1965.
117. Hamilton PW, Thompson D, Sloan JM, Bartels PH. Knowledge-guided segmentation and morphometric analysis of colorectal dysplasia. *Anal Quant Cytol Histol* 1995;17(3):172-82.
118. Nadel EM. Computer analysis of cytometric fields by the CYDAC and its historical evolution from the cytoanalyzer. *Acta Cytol* 1965;9:203.
119. Prewitt JMS, Mendelsohn ML. The analysis of cell images. *Ann NY Acad Sci* 1966;128:1035-1053.
120. Mendelsohn ML, Mayall BH, Prewitt JMS. Digital transformation and computer analysis of microscope images. In: Coslett V, Barer R, editors. *Advances in optical and electron-microscopy*. New York: Academic Press; 1968. p. 77-150.
121. Wied GL, Bartels PH, Bahr GF, Oldfield DG. Taxonomic intra-cellular analytic system (TICAS) for cell identification. *Acta Cytol* 1968;12(3):180-204.
122. Sandritter W, Kiefer G. Objectivation of chromatin patterns using the fast scanning stage of the UMSP 1. In: Wied G, Bahr G, editors. *Automated cell identification and cell sorting*. New York: Academic Press; 1970. p. 177-185.
123. Bartels PH, Olson GB. Computer analysis of lymphocyte images. In: Catsimpoolas N, editor. *Biological separations*. New York: Plenum Press; 1977. p. 1-99.
124. Baak JPA. *Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis*. Berlin: Springer-Verlag; 1991.
125. Wied GL, Bahr GF, Bartels PH. *The automation of uterine cancer cytology*. Chicago: *Tutorials of Cytology*; 1976.
126. Pressman N, Wied GL. *The automation of cancer cytology and cell image analysis*. 1979: *Tutorials of Cytology*; 1979.

127. Oberholzer M. Morphometrie in der klinischen Pathologie. Berlin: Springer Verlag; 1983.
128. Greenburg SD. Computer assisted image analysis cytology. Basel: S. Karger; 1984.
129. Burger G, Ploem GS, Goerttler K. Clinical cytometry and histometry. London: Academic Press; 1987.
130. Preston K, Bartels PH. Automated image processing for cells and tissue. In: Newhouse VL, editor. Progress in medical imaging. Berlin: Springer; 1988.
131. Taylor J, Bartels PH, Bibbo M, Wied GL. Automated hierarchic decision structures for multiple category cell classification by TICAS. *Acta Cytol* 1978;22(4):261-7.
132. Bartels HG, Bartels PH, Bibbo M, Wied GL. Stabilized binary hierarchic classifier in cytopathologic diagnosis. *Anal Quant Cytol* 1984;6(4):247-61.
133. Bahr GF, Bartels PH, Bibbo M, De Nicolas M, Wied GL. Evaluation of the Papanicolaou stain for computer assisted cellular pattern recognition. *Acta Cytol* 1973;17:106-112.
134. Zeiss C. Universal Mikro-Spektrophotometer UMSP 1 [Pamphlet No. 40-811/I-e]. Oberkochen, Germany; 1964.
135. Bibbo M, Kim DH, di Loreto C, Dytch HE, Galera-Davidson H, Thompson D, et al. Tissue architectural features for the grading of prostatic carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1990;12(4):229-36.
136. Bibbo M, Bartels PH, Pfeifer T, Thompson D, Minimo C, Davidson HG. Belief network for grading prostate lesions. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15(2):124-35.
137. HGMIS. (Human Genome Management Information System). The Human Genome Project (online). In: <http://www.ornl.gov/hgmis/project/project.html> ed: Office of Biological and Environmental Research, U.S. Department of Energy; 1998.

138. NLM, NIH. National Center for Biotechnology Information (online). In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ed: U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health. Bethesda, MD, USA; 1998.
139. Stubbs DF, Webre NW. Introduction. In: Stubbs DF, Webre NW, editors. Data structures with abstract data types and Pascal. Monterey, CA: Brooks Cole Pub. Co.; 1985. p. xviii, 459.
140. Langley FA, Baak JPA, Oort J. Diagnosis: error sources. In: Baak JPA, editor. Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis. Berlin: Springer-Verlag; 1991. p. 19-27.
141. Bartels PH, Olson GB, Lockart R, Wied G. Cytomorphometric studies of cell populations. *Cell Biophys* 1980;2:339-351.
142. Buchanan BG, Shortliffe EH. Rule-based expert systems. Reading: Addison-Wesley; 1984.
143. Giarrantano J, Riley G. Expert systems. Boston: PWS Kent; 1989.
144. Kandel A. Fuzzy expert systems. Boca Raton: CRC Press; 1992.
145. Jackson P. Introduction to expert systems. Wokingham, UK: Addison-Wesley; 1986.
146. Bartels PH, Weber JE. Expert systems in histopathology I: Introduction and overview. *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11:1-7.
147. Bartels PH, Hiessl H. Expert systems in histopathology. II. Knowledge representation and rule-based systems. *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11(3):147-53.
148. Bartels PH, Thompson D. Expert systems in histopathology. III. Representation of knowledge as "structured objects". *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11(6):367-74.
149. Bartels PH, Thompson D, Weber JE. Expert systems in histopathology. IV. The management of uncertainty. *Anal Quant Cytol Histol* 1992;14(1):1-13.

150. Bartels PH, Thompson D, Bibbo M, Weber JE. Bayesian belief networks in quantitative histopathology. *Anal Quant Cytol Histol* 1992;14(6):459-73.
151. DARPA. Case based reasoning. Proceedings of a workshop on case-based reasoning. In: DARPA, editor. Case based reasoning; 1989; San Mateo, Calif.: Morgan Kaufmann; 1989.
152. Rosai J. Borderline epithelial lesions of the breast. *Am J Surg Pathol* 1991;15:209-221.
153. Kruse R, Schwecke E, Heinsohn J. Uncertainty and vagueness in knowledge based systems : numerical methods. Berlin ; New York: Springer-Verlag; 1991.
154. Pearl J. Probabilistic reasoning in intelligent systems : networks of plausible inference. San Mateo, Calif.: Morgan Kaufmann Publishers; 1988.
155. Kestenbaum D. Time's Tiny Arrow Revealed. <http://sciencenow.sciencemag.org/cgi/content/full/1998/1020/1>. In: ScienceNow. The American Association for the Advancement of Science; 1998.
156. Kestenbaum D. Particle decays reveal arrow of time. *Science* 1998;282:602-603.
157. Schrödinger E. What is life? London: Cambridge University Press; 1992.
158. Bishop JM, Weinberg RA. Introduction. In: Bishop JM, Weinberg RA, editors. *Molecular Oncology*. New York: Scientific American; 1995. p. 1-11.
159. Zadeh L. Outline of a new approach to the analysis of complex systems and decision processes. *IEEE Trans Systems, Man and Cybernetics* 1973;SMC-3(1):28-44.
160. Montironi R, Bartels PH, Thompson D, Scarpelli M, Hamilton PW. Prostatic intraepithelial neoplasia. Development of a Bayesian belief network for diagnosis and grading. *Anal Quant Cytol Histol* 1994;16(2):101-12.
161. Montironi R, Bartels PH, Thompson D, Bartels HG, Scarpelli M. Prostatic intraepithelial neoplasia. Quantitation of the basal cell layer with machine vision system. *Pathol Res Pract* 1995;191(9):917-23.

162. Bartels PH, Thompson D, Bartels HG, Montironi R, Scarpelli M, Hamilton PW. Machine vision-based histometry of premalignant and malignant prostatic lesions. *Pathol Res Pract* 1995;191(9):935-44.
163. Bartels PH, Thompson D, Montironi R, Hamilton PW, Scarpelli M. Diagnostic decision support for prostate lesions. *Pathol Res Pract* 1995;191(9):945-57.
164. Mariuzzi GM, Mariuzzi L, Mombello A, Santinelli A, V.D. DS, Thompson D, et al. Quantitative study of ductal breast cancer progression: nuclear signatures in proliferating breast lesions. *Anal Quant Cytol Histol* (submitted) 1999.
165. 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* 1999:em publicação.
166. Bostwick DG, Brawer MK. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* 1987;59(4):788-94.
167. Stevens A. The haematoxilins. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 1990. p. 107-118.
168. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29(4):577-80.
169. Bostwick DG, Eble JN. *Urologic surgical pathology*. St. Louis: Mosby-Year Book; 1997.
170. Brawer MK, Peehl DM, Stamey TA, Bostwick DG. Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res* 1985;45(8):3663-7.
171. O'Malley FP, Grignon DJ, Shum DT. Usefulness of immunoperoxidase staining with high-molecular-weight cytokeratin in the differential diagnosis of small-acinar lesions of the prostate gland. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990;417(3):191-6.

172. Hedrick L, Epstein JI. Use of keratin 903 as an adjunct in the diagnosis of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1989;13(5):389-96.
173. Bartels PH, Montironi R, Thompson D, Vaught L, Hamilton PW. Statistical histometry of the basal cell / secretory cell bilayer in prostatic intraepithelial neoplasia. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20:381-388.
174. McNeal JE, Villers A, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Microcarcinoma in the prostate: its association with duct-acinar dysplasia. *Hum Pathol* 1991;22(7):644-52.
175. Bartels PH, Thompson D. The video photometer. In: Marchevsky AM, Bartels PH, editors. *Image analysis: a primer for pathologists*. New York: Raven Press; 1994. p. 29-56.
176. Inoué S, Spring KR. Detection of light and monochrome Vidicon Cameras. In: Inoué S, Spring KR, editors. *Video Microscopy*. New York: Plenum Press; 1997. p. 233-271.
177. Cawsey A. Expert Systems. In: Cawsey A, editor. *The essence of artificial intelligence*. Hertfordshire, England: Prentice Hall Europe; 1998. p. 40-68.
178. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 1992;23:273-279.
179. Thomas R, Lewis RW, Sarma DP, Coker GB, Rao MK, Roberts JA. Aid to accurate clinical staging-histopathologic grading in prostatic cancer. *J Urol* 1982;128:726-728.
180. McNeal JE, Villers AA, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Histologic differentiation, cancer volume and pelvic lymph node metastasis in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1990;52:246-251.
181. Sokal R, Rohlf F. Assumptions of analysis of variance. In: Sokal R, Rohlf F, editors. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. New York: W.H. Freeman; 1995. p. 392-440.

182. Tatsuoka M. Discriminant analysis: the study of group differences. In: Champaign, Ill, USA: Institute for Personality and Ability Testing; 1971.
183. Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors. *Annu Rev Med* 1979;30:135-43.
184. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987;238(4824):193-7.
185. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194(4260):23-8.
186. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:541-73.
187. 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.
188. 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.
189. Penman S. Rethinking cell structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(12):5251-7.
190. 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.
191. 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.
192. 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.
193. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers [In Process Citation]. *Nature* 1998;396(6712):643-9.
194. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988;53(4):549-54.
195. Nowell PC. Genetic alterations in leukemias and lymphomas: impressive progress and continuing complexity. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;94(1):13-9.
196. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Catalogue of chromosome aberrations in cancer. New York: Wiley-Liss; 1994.
197. Zhuang Z, Park WS, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E, et al. Trisomy 7 harbouring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1998;20(1):66-9.
198. 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.
199. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985;313(18):1111-6.
200. Heppner GH, Miller FR. The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol* 1998;177:1-56.
201. Orr-Weaver TL, Weinberg RA. A checkpoint on the road to cancer [news; comment]. *Nature* 1998;392(6673):223-4.
202. Strauss BS. The origin of point mutations in human tumor cells. *Cancer Res* 1992;52(2):249-53.

203. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87(2):159-70.
204. Heim S, Mandahl N, Mitelman F. Genetic convergence and divergence in tumor progression. *Cancer Res* 1988;48(21):5911-6.
205. 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.
206. 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.
207. Sentinelli S. Mucins in prostatic intra-epithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *Histopathology* 1993;22(3):271-4.
208. Bostwick DG, Dousa MK, Crawford BG, Wollan PC. Neuroendocrine differentiation in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1994;18(12):1240-6.
209. Kleinerman DI, Troncoso P, Lin SH, Pisters LL, Sherwood ER, Brooks T, et al. Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: implication as a tumor suppressor. *Cancer Res* 1995;55(6):1215-20.
210. Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A. Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 1996;29(2):117-34.
211. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [see comments]. *Science* 1994;266(5193):2011-5.

212. Maygarden SJ, Novotny DB, Moul JW, Bae VL, Ware JL. Evaluation of cathepsin D and epidermal growth factor receptor in prostate carcinoma. *Mod Pathol* 1994;7(9):930-6.
213. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(24):11733-7.
214. Myers RB, Srivastava S, Grizzle WE. Lewis Y antigen as detected by the monoclonal antibody BR96 is expressed strongly in prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 1995;153(5):1572-4.
215. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, et al. Laser capture microdissection [see comments]. *Science* 1996;274(5289):998-1001.
216. Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet* 1998;14(7):272-6.
217. Zitzelsberger H, Kulka U, Lehmann L, Walch A, Smida J, Aubele M, et al. Genetic heterogeneity in a prostatic carcinoma and associated prostatic intraepithelial neoplasia as demonstrated by combined use of laser- microdissection, degenerate oligonucleotide primed PCR and comparative genomic hybridization. *Virchows Arch* 1998;433(4):297-304.
218. Hulka BS, Margolin BH. Methodological issues in epidemiologic studies using biologic markers. *Am J Epidemiol* 1992;135(2):200-9.
219. 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.

220. Singh DK, Lippman SM. Cancer chemoprevention. Part 2: hormones, nonclassic antioxidant natural agents, NSAIDs, and other agents [In Process Citation]. *Oncology* (Huntingt) 1998;12(12):1787-800; discussion 1802, 1805.
221. Eshbaugh WG, Jr., Forley BG, Ritter EF, Serafin D, Klitzman B. Stimulation of DNA synthesis in human epidermis by UVB radiation and its inhibition by difluoromethylornithine. *Plast Reconstr Surg* 1990;85(4):593-6.
222. Love RR, Carbone PP, Verma AK, Gilmore D, Carey P, Tutsch KD, et al. Randomized phase I chemoprevention dose-seeking study of alpha- difluoromethylornithine. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(9):732-7.
223. Pak HY, Ashdjian V, Yokota SB, Teplitz RL. Quantitative DNA determinations by image analysis. I. Application to human pulmonary cytology. *Anal Quant Cytol* 1982;4(2):95-104.
224. Koss LG. Tumors of the lung: conventional cytology and aspiration biopsy. In: Koss LG, editor. *Diagnostic Cytology and Its Hitopathologic Basis*. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1992. p. 769-864.
225. Nieburgs HE. Recent progress in the interpretation of malignancy associated changes. *Acta Cytol* 1968;12:445-453.
226. Sun XR, MacAulay C, Palcic B. Expression of malignancy associated changes in lung epithelial cells of lung cancer patients. In: Palcic B, editor. *XII International Congress on Diagnostic Quantitative Pathology*; 1998; Vancouver, BC, Canada: International Society for Diagnostic Quantitative Pathology; 1998. p. 23.
227. Ahrendt SA, Chow JT, Li-Hua X, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:332-9.

228. Payne PW, Sebo TJ, Doudkine A, Garner D, MAcAulay C, Lam S, et al. Sputum screening by quantitative microscopy: a reexamination of a portion of the National Cancer Institute Cooperative early lung cancer study. *Mayo Clinic Proc* 1997;72:697-704.
229. Brunstein CG. Detecção imunocitoquímica da proteína p53 no lavado brônquico de pacientes com suspeita clínica de carcinoma brônquico. . Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1998.
230. Sokal R, Rohlf F. Correlation. In: Sokal R, Rohlf F, editors. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. New York: W.H. Freeman; 1995. p. 555-608.
231. Barroso MEG. Dicionário Aurélio Eletrônico. In.: 1.4 ed. São Paulo: Nova Fronteira; 1994.
232. Kolodner J. What is case-based reasoning? In: Kolodner J, editor. *Case-based reasoning*. San Mateo: Morgan Kaufman; 1993. p. 3-32.
233. Inoué S, Spring KR. Why video? In: Inoué S, Spring KR, editors. *Video Microscopy*. New York: Plenum Press; 1997. p. 1-9.