

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas

**ASSINATURA DIGITAL EM BIÓPSIAS DE CÂNCER DE RETO**

Aluno: Roberto Amaral

Tese para obtenção do grau de Doutor

Porto Alegre

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas

**ASSINATURA DIGITAL EM BIÓPSIAS DE CANCER DE RETO**

Aluno: Roberto Amaral

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Moreira

Tese para obtenção do grau de Doutor

Porto Alegre

2008

**A485a** Amaral, Roberto  
Assinatura digital em biópsias de câncer de reto / Roberto  
Amaral ; orient. Luis Fernando Moreira. – 2008.  
59 f. : il. Color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação  
em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Neoplasias retais 2. Adenocarcinoma 3. biópsia 4.  
Diagnóstico por imagem 5. Prognóstico I. Moreira, Luis  
Fernando II. Título.

NLM: WI 610

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Este trabalho segue os quesitos de uniformidade para trabalhos submetidos a jornais biomédicos de acordo com o Comitê Internacional de Editores de Periódicos Médicos (Vancouver Style).

## **AGRADECIMENTOS**

A todos, pessoas e instituições, que de alguma forma colaboram na elaboração deste trabalho, o meu reconhecimento.

Ao **Prof. Dr. Luis Fernando Moreira**, por sua orientação, apoio, estímulo, seriedade e sempre, pela grande amizade.

Ao **Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva**, pela transmissão de sua experiência e conhecimento ensinando-me o “caminho das pedras” na análise digital.

Ao **Prof. Dr. Mário Antonello Rosito**, chefe do Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pela oportunidade de me permitir seguir os seus passos na área da análise digital.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Prolla**, da UFRGS, Chefe Unidade de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), inicialmente pela grande generosidade de permitir a realização do trabalho e por fim, pela infinita paciência no ensino da escolha dos campos a serem capturados.

A **Prof. Dra. Leila Beltrami Moreira**, colega do Departamento de Farmacologia ICBS/UFRGS e da COMEDI/HCPA pelo apoio e suporte decisivos.

Ao ex-aluno, **Dr. Júlio de Oliveira Espinel** pelo auxílio na pesquisa do SAMIS-HCPA no início da pesquisa.

À filha e doutoranda **Juliana Trindade Amaral** pela ajuda na execução do trabalho de captura e processamento de imagens dos núcleos.

Aos **colegas da direção do Departamento de Medicina Legal – IGP/RS** pela ajuda e compreensão das minhas ausências.

A **Sra. Estela Maris Araripe**, secretária do Programa de Pós-Graduação, por sua atenção, eficiência e carinho ao longo de tantos anos.

Aos **coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia**, por possibilitarem a realização do projeto.

Ao **Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA**, pelas orientações e financiamento através do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Estudo.

Ao **Serviço de Anatomia Patológica do HCPA**, pela permissão do uso do material de seu acervo.

Aos meus pais, **Diogo Amaral e Zulmira Westphalen Amaral**, pelo exemplo e amor de uma vida inteira.

Ao meu filho **Thiago**, meu fiel companheiro e a minha filha **Juliana**, minha futura colega, pelo amor e compreensão demonstrados.

A minha esposa **Suzana**, companheira de muitos caminhos e de outros tantos que não de vir, pelo incansável apoio, paciência, compreensão e, principalmente, amor.

“Todo pasa y todo queda,  
pero lo nuestro es pasar,  
pasar haciendo caminos,  
caminos sobre el mar....  
Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.”

Cantares – Antonio Machado

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	V
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	01
OBJETIVOS	03
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	04
MATERIAL E MÉTODOS	11
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	23
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	28
REFERÊNCIAS	30
ANEXO 1 - ARTIGO	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CCD</b>	Charge coupled device, componente principal das videocâmaras
<b>COG/SSOG</b>	Cirurgia Oncológica Gastrointestinal /Southern Surgical Oncology Group;
<b>DMPN</b>	Distância média padronizada da população normal
<b>DOT ou OD</b>	Densidade optical total
<b>EF</b>	Effect Size
<b>FAMED</b>	Faculdade de Medicina de Porto Alegre
<b>GPPG</b>	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
<b>HCPA</b>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>N</b>	Número de casos
<b>P</b>	Significância estatística
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>TEP</b>	Tamanho do efeito padronizado
<b>TICAS</b>	Taxonomic intra-cellular analytic system
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## LISTA DE FIGURAS

1. Campos microscópicos de imagem digital de biópsias de adenocarcinoma de reto (HE, 500x) e fragmento de arquivo de núcleos segmentados de adenocarcinoma de reto	14
2. Assinatura nuclear dos grupos biópsias, controles e peças cirúrgicas do banco	20
3. Assinatura nuclear dos grupos biópsias e peças cirúrgicas das biópsias	20
4. Assinatura nuclear dos grupos biópsias e peças cirúrgicas do banco	21
5. Distribuição dos valores médios da DOT por grupo	22

## LISTA DE TABELAS

1. Distribuição dos grupos de lâminas avaliadas	18
2. Características das amostras e suas comparações	19
3. Comparação das características pelo TEP	19
4. Assinatura nuclear média de cada grupo	21

## RESUMO

O carcinoma colorretal, dentre os tumores malignos, é a terceira causa de morte no mundo ocidental. A localização retal da doença gira em torno de 25 a 30% dos casos. No Brasil, ocupa a quarta posição em número de casos incidentes.

Os melhores fatores prognósticos dependem da avaliação histopatológica (TNM ou Dukes e modificações) reforçando a necessidade de se investigar fatores prognósticos efetivos ainda na fase pré-operatória.

Estudos anteriores demonstraram que a assinatura digital obtida a partir de peças cirúrgicas claramente caracterizava o adenocarcinoma de reto e que esta assinatura guardava valor prognóstico independente para desfechos clínicos.

O presente estudo avaliou a hipótese de a assinatura digital e a assinatura nuclear média de biópsias de lesões histologicamente caracterizadas como adenocarcinoma de reto serem representativas das peças cirúrgicas dos tumores correspondentes permitindo sua utilização já na fase pré-operatória.

Foram analisados 7113 núcleos obtidos das peças cirúrgicas de 51 casos de adenocarcinoma primário de reto, de biópsias colonoscópicas correspondentes e de 22 controles (tecido de reto normal) pertencentes ao banco de dados atualizado do grupo de pesquisa de Cirurgia Oncológica Gastrointestinal (Southern Surgical Oncology Group; COG/SSOG) do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. A partir deste banco, os dados foram analisados nos seguintes grupos: biópsias colonoscópicas (biópsias), peças cirúrgicas correspondentes a estas biópsias (peças cirúrgicas das biópsias), todas as peças cirúrgicas do banco original (peças cirúrgicas do banco) e controles normais (controles).

Na análise das principais características da assinatura digital do adenocarcinoma de reto, o grupo biópsias foi estatisticamente diferente do grupo controle, área ( $p= 0,012$ ), DOT ( $p= 0,000$ ) e granularidade ( $p= 0,03$ ); assim como para a assinatura nuclear média (10,09 vs

0,864;  $p= 0,000$ ). Quando a assinatura digital do grupo biópsias foi comparada com a do grupo peças cirúrgicas das biópsias, não houve diferença estatística nas características DOT ( $p= 0,11$ ) e granularidade ( $p= 0,47$ ) enquanto a avaliação pelo TEP (tamanho do efeito padronizado) não mostrou nenhuma diferença estatística nas três características estudadas.

Na comparação do grupo biópsias com o grupo peças cirúrgicas do banco, as características área e DOT diferiram estatisticamente (área  $p= 0,00$  e DOT  $p= 0,01$ ). No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na comparação das assinaturas nucleares médias.

O estudo demonstrou que biópsias colonoscópicas de adenocarcinoma de reto são diferentes, pela análise da assinatura digital e seus componentes, de tecido de reto normal. Ao mesmo tempo, pelas mesmas variáveis, guardam relação com as peças cirúrgicas de onde foram extraídas bem como com aquelas constituintes do banco de dados original podendo ser utilizadas na fase pré-operatória como fator prognóstico adicional para melhor determinar conduta no tratamento do câncer primário de reto.

## ABSTRACT

The colorectal carcinoma is one of the most common malignant tumors in the western world, being the third cause of death in these continents and showing the rectal site in approximately 25% to 30% of the cases.

The best prognostic factors for rectal tumors depend on the histopathologic evaluation (TNM or Dukes and its modifications) reinforcing the need for searching effective prognostic factors in the preoperative stage yet.

Our previous studies have demonstrated that digital signature, obtained from surgical specimens, has shown independent prognostic value for clinical outcomes and depicted nuclear area, total optic density (OD) and clumpness as the main characteristics of this signature.

In this study we attempted to demonstrate that the digital signature of preoperative colonoscopic tumor biopsies would resemble the digital signature of surgical specimen counterparts, i. e., from resected tumors where those biopsies were taken from.

High-resolution imagery of 7113 nuclei was digitally recorded from 22 biopsy samples of normal rectal tissues and from 51 surgical specimens of rectal cancer (including 12 biopsy samples counterparts). The three main characteristics (area, optical density and clumpness) descriptive of the spatial and statistical distribution of nuclear texture for rectal cancer were computed for each nucleus according to TICAS system for cell identification. From this database tumor biopsies (biopsy), biopsy surgical specimen counterparts (biopsy specimen), surgical specimens of the whole database bank (surgical specimen) and normal rectal biopsies (controls) were compared.

Digital signature and average nuclear signature ( $P= 0.000$ ) of the tumor biopsy group were significantly different from controls. When nuclear characteristics and digital signatures were compared between the biopsy and the biopsy specimen groups, the OD and clumpness characteristics ( $P= 0.11$ ;  $P= 0.47$ ) as well as the standardized difference (effect-size) have not shown any statistical difference. Also, when comparing the average

nuclear signatures of the surgical specimen group with the tumor biopsy group no statistical difference was observed.

Considering these results it can be assumed that nuclear characteristics of the digital signatures and the average nuclear signatures of biopsies, histologically characterized as rectal cancer, can consistently represent the surgical specimen counterparts and can be used as an additional preoperative prognostic factor aiming to better define treatment approach on rectal cancer.

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O carcinoma colorretal é um dos tumores malignos mais comuns no mundo ocidental, sendo a terceira causa de morte nestes continentes; é responsável por 50% dos casos de câncer na população acima dos 65 anos, sendo um dos tumores mais freqüentes em mulheres além dessa idade<sup>1,2</sup>. A localização retal corresponde a aproximadamente 25 a 30% dos casos da doença<sup>2</sup> com estimativa nos Estados Unidos, de 40.740 novos casos para o ano de 2008<sup>3</sup>.

Apesar do desenvolvimento das técnicas de rastreamento para câncer colorretal, 30 a 40% dos pacientes apresentam-se com doença loco-regional avançada ou com metástases o que os impede de candidatarem-se a procedimentos potencialmente curativos tornando-se importante problema de saúde pública em nível mundial<sup>4</sup>. Além disso, tanto disseminação à distância quanto recorrência pélvica podem, nos casos de pacientes com adenocarcinoma de reto submetidos à ressecção cirúrgica curativa, afetar o prognóstico destes pacientes<sup>5</sup>.

Até os dias atuais, o prognóstico no carcinoma colorretal tem sido avaliado por aspectos histopatológicos e o mais importante fator prognóstico independente tem permanecido o estadiamento, seja pelo TNM ou pela classificação de Dukes e modificações (Turnbull, Astler-Coller)<sup>6</sup>.

O estadiamento clínico pré-operatório tem valor limitado devido ao grau de fidedignidade dos métodos diagnósticos não invasivos, embora métodos modernos de avaliação de imagem possam ser utilizados<sup>7</sup> e porque o estadiamento patológico completo só é possível após exploração e ressecção cirúrgica adequadas. Desta forma, a pesquisa pelo desenvolvimento de novos métodos diagnósticos pré-operatórios que auxiliem o estadiamento clínico tem sido um dos campos mais estudados nesta área. Alguns aspectos histopatológicos (pouca diferenciação, invasão linfovascular e produção de muco) têm sido associados a pior prognóstico, porém trata-se de avaliação bastante subjetiva, semi-quantitativa e variável em diferentes áreas do tumor<sup>8</sup>, variando também nas interpretações

possíveis<sup>9,10</sup>. Assim sendo, há necessidade de se buscar outros parâmetros prognósticos que possam ser obtidos ainda, preferentemente, na fase pré-operatória.

Rosito e cols.<sup>11</sup>, baseado em estudos preliminares de Bartels e cols<sup>12</sup> e Da Silva e cols.<sup>13</sup>, caracterizou as assinaturas digitais de tumores de reto que claramente diferiam das assinaturas digitais de tecido normal de reto. Além disso, também demonstrou que algumas das características nucleares constituintes desta assinatura digital (área, granularidade, densidade óptica total) além da assinatura nuclear média, guardavam valor prognóstico independente em relação a desfechos clínicos como mortalidade.

No entanto, a aplicabilidade clínica destes achados era limitada uma vez que para sua obtenção seria necessária a avaliação da assinatura digital das peças cirúrgicas e com isto, se perderia a possibilidade de realização de intervenções que fossem capazes de impactar positivamente sobre desfechos clínicos do câncer de reto.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade das características nucleares e da assinatura digital, obtida das biópsias, representarem com fidedignidade as mesmas características das assinaturas digitais das peças cirúrgicas das quais são originárias permitindo, desta forma, a utilização dessa assinatura como fator prognóstico no manejo do adenocarcinoma de reto.

## 2. OBJETIVOS

- Verificar se as características nucleares e a assinatura digital de biópsias colonoscópicas de lesões em pacientes com adenocarcinoma de reto são diferentes de amostras de tecido de reto normal.
- Avaliar se as características daquelas biópsias correspondem e guardam relação com as peças cirúrgicas dos tumores das quais foram obtidas.
- Determinar se essas biópsias também guardam relação, nas características nucleares e assinaturas digitais com as demais peças de adenocarcinoma de reto do banco de dados original.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O carcinoma colorretal, dentre os tumores malignos, é sério problema de saúde pública ao nível mundial. Com um número estimado de mais de um milhão de novos casos por ano, na avaliação mais atual, correspondeu a 9,4% da incidência de todos os novos casos de câncer em todo o mundo<sup>14,15</sup>. Segundo esses dados, a prevalência mundial está em torno de 2.800.000 casos ocupando assim o segundo lugar. Ainda em nível mundial, quanto à incidência, o câncer colorretal está em quarto lugar entre os homens e em terceiro entre as mulheres. Nas estimativas, a sobrevida em 5 anos varia de acordo com o desenvolvimento do país apresentando taxas que vão de 65 a 54% nos Estados Unidos e Europa até valores como 30% na Índia<sup>14,15</sup>.

As taxas de incidência dessa doença variam de acordo com a distribuição geográfica mundial existindo diferenças de até 25 vezes entre localidades distintas. Quanto à localização das lesões ao longo do cólon e reto parece existir uma tendência de, em populações de alto risco, esta taxa ser de 2:1 enquanto que naquelas com baixo risco essa taxa se equivale. Essas diferenças são possivelmente devidas aos múltiplos fatores de risco relacionados à doença, por exemplo, consumo de carne, gordura animal e fibras. Estudos epidemiológicos têm demonstrado também que a atividade física, a obesidade e distribuição da gordura corporal são fatores importantes para o risco de desenvolvimento da doença<sup>16</sup>.

De forma geral as taxas de sobrevida da doença têm apresentado crescimento naqueles países onde o risco era, inicialmente, mais baixo enquanto que nos países, ditos, de risco elevado o aumento das taxas tem se mantido

estabilizado refletindo o efeito de medidas de saúde pública que visam controlar a doença<sup>3,15</sup>.

No Brasil, o câncer colorretal ocupa o quarto lugar em número de casos incidentes correspondendo a 7,7% de todos os tumores diagnosticados, excluindo-se os tumores de pele não melanoma<sup>17</sup>.

O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil, no ano de 2008, é de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13 e 15 novos casos a cada 100 mil homens ou mulheres, respectivamente. Desconsiderando-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto é o terceiro mais freqüente em homens na região Sudeste (19/100.000), o quarto nas regiões Sul (21/100.000) e Centro-Oeste (10/100.000), e nas regiões Nordeste (4/100.000) e Norte (3/100.000) ocupa a quinta e sexta posição, respectivamente<sup>17</sup>. No Rio Grande do Sul, para o ano de 2008, são estimados 3060 novos casos de câncer colorretal<sup>17</sup>.

Embora o diagnóstico de carcinoma “de novo” esteja aumentando, a *tumorigênese* do carcinoma colorretal tem sido considerada um processo complexo de uma série de mutações gênicas, levando lesões precursoras ao carcinoma invasivo e metástases – a seqüência adenoma-carcinoma<sup>18-20</sup>. Alterações genéticas específicas podem conferir graus variáveis de agressividade e o estabelecimento de uma correlação entre o dano genético e prognóstico tem sido alvo de extensas investigações ao longo dos anos<sup>8,21,22</sup>.

O prognóstico dos desfechos clínicos da doença é estabelecido por especialistas alicerçados nos elementos diagnósticos disponíveis. Fatores que seguramente afetam este prognóstico incluem o estadiamento do tumor, a idade, o estado geral de saúde do indivíduo e a resposta ao tratamento. Mas mesmo

baseando nestes fatores, o prognóstico sempre será um exercício de previsão que poderá ser mais ou menos fidedigno dependendo dos elementos utilizados para estabelecer aquele raciocínio prognóstico. Desta forma, ainda hoje, o estadiamento pelo TNM ou pela classificação de Dukes<sup>23</sup>, com suas modificações (Turnbull e Astler Coller)<sup>24,25</sup>, apresentam valor significativo neste exercício prognóstico<sup>6</sup>.

Embora, atualmente se disponha de variado arsenal de métodos diagnósticos não invasivos, em função do grau de fidedignidade destes, o estadiamento pré-operatório não é definitivo até porque o estadiamento patológico completo apenas será firmado após exame da peça cirúrgica<sup>7</sup>. Assim, esforços no sentido de desenvolver métodos diagnósticos pré-operatórios que auxiliem o estadiamento clínico têm aberto amplo campo investigacional. Na busca por fatores que possam se associar ao prognóstico, vários aspectos histopatológicos como diferenciação, invasão linfovascular, angiogênese, produção de muco e outros como magnificação e cromoscopia têm sido utilizados. Porém, na sua maioria estas avaliações são semiquantitativas, variáveis em áreas distintas do tumor e conseqüentemente interferindo nas interpretações<sup>8,26-31</sup>. Isto justifica a procura por parâmetros prognósticos obtidos, de preferência, na fase pré-operatória que possam de forma definitiva auxiliar no planejamento do tratamento da doença. Muitos estudos na área da biologia molecular, alterações genéticas e de mecanismos de controle do ciclo celular vêm sendo amplamente realizados ultimamente na busca de maior compreensão da tumorigênese e dos comportamentos biológicos dos tumores colorretais<sup>32-36</sup>. Índices de proliferação anormal e expressão de determinados oncogenes ou genes supressores de tumores têm sido determinados em várias neoplasias humanas, inclusive no

carcinoma colorretal<sup>37,38</sup>.

O p53 é um dos genes mais estudados. Apresenta-se comumente mutado no câncer humano perdendo, com isso, o seu papel regulador ao ficar inativado fato que ocorre em quase metade dos tumores<sup>39</sup>. Estudo recente sugere que o tumor colorretal que apresenta p53 mutante tem resposta fraca ou nula à quimioterapia, enquanto a presença do p53 selvagem parece predizer melhor resposta ao tratamento adjuvante<sup>40</sup>. Além disso, mutações nos genes APC, K-ras também têm sido relacionadas a pior prognóstico e diminuição de sobrevida<sup>41,42</sup>. Outros marcadores moleculares como deleção do 18q (DCC), p27 e instabilidade de microsatélites também são indicadores promissores de prognóstico<sup>43,44</sup>.

Além dos oncogenes e genes supressores de tumor, alguns fatores que regulam o crescimento celular podem funcionar como colaboradores do desenvolvimento tumoral. O bcl-2, protooncogene envolvido na regulação da morte celular inibindo a apoptose em vários sistemas celulares em condições fisiológicas e neoplásicas, pode ser utilizado como fator preditivo de prognóstico para o câncer colorretal<sup>45</sup>. O campo de pesquisa na área de biologia molecular é extremamente vasto e novas áreas de interesse como, por exemplo o estudo do gene EphA1<sup>46</sup>, das mutações do BRAF<sup>36</sup>, do PIK3CA<sup>47</sup>, da perda de expressão do MUC2<sup>48</sup> além do extensivo estudo sobre o comportamento de lesões planas<sup>49-51</sup> e de adenomas serrilhados<sup>52</sup> tem sido realizados com a finalidade de procurar novas formas, que possam verificar possíveis implicações na utilização destes marcadores no prognóstico das lesões neoplásicas colorretais<sup>53,54</sup>.

Apesar dos avanços obtidos tanto na cirurgia colorretal como em novas abordagens multimodais, o câncer de reto ainda é uma doença de difícil tratamento. Muitas das alterações genéticas e da expressão oncogênica já foram

estudadas, no entanto, o papel exato destas informações, bem como a utilização clínica como fator prognóstico daquelas lesões ainda está por ser definido.

A associação da histologia com a tecnologia digital e a teoria da informação criou um novo marco na avaliação prognóstica de tumores ao combinar técnicas de videomicroscopia digital ao processamento de imagens microscópicas aplicadas a interpretação de dados clínicos.

Em 1968, o projeto TICAS (taxonomic intra-cellular analytic system)<sup>55</sup> baseado nos padrões de distribuição espacial da cromatina nuclear, demonstrou alta taxa de caracterização do material estudado. Estudos subseqüentes recomendaram este sistema para estudos objetivos da cromatina<sup>56</sup> evidenciando diferenças pronunciadas entre células de tipo histológico distintos iniciando, com isso, sua aplicabilidade clínica.

No início dos anos 90 foram realizados estudos, alguns destes pelo grupo de Bartels, avaliando a textura nuclear de glândula, pólipos e tumores colorretais por imagem computadorizada<sup>57-59</sup>

Já no final daquela década, Bartels e cols. analisando a assinatura da textura da cromatina nuclear em lesões neoplásicas prostáticas de diferentes graus e comparando-as com as assinaturas de núcleos normais, mostraram o valor da caracterização de núcleos e lesões da próstata, com possíveis implicações prognósticas<sup>12,60</sup>. No Brasil, após introdução deste método por Prolla JC, Da Silva e cols. também estudando núcleos de espécies cirúrgicas de próstata, analisaram as características da textura da cromatina, concluindo que estas permitiam informações de relevância prognóstica<sup>13</sup>. Ferrer-Roca e cols.<sup>61</sup>, ao estudarem tecido neoplásico de tireóide por essa técnica, encontraram evidências similares.

O método da assinatura nuclear digital é um conjunto de características densimétricas baseadas na distribuição da cromatina nuclear<sup>62</sup> descritos em padrões de características numéricas definidas e das quais algumas são mais representativas<sup>55</sup>. A demonstração dessa assinatura é realizada com histogramas que englobam o conjunto destas características de textura da cromatina nuclear. A assinatura digital é produzida a partir da análise de imagem digitalizada da microscopia óptica convencional. Para a digitalização de imagens são utilizadas lâminas coradas em Hematoxilina-Eosina ou Feulgen. Tais imagens permitem a avaliação do núcleo em material citológico, tecidos histológicos normais ou que apresentem alterações morfológicas relacionadas a processos neoplásicos. Vários estudos têm se utilizado da técnica na busca de novos parâmetros de interpretação e entendimento dos processos neoplásicos da cérvix uterina, endométrio, pâncreas e mucosa colônica<sup>63-68</sup>.

O maior estudo focando o adenocarcinoma primário de reto foi realizado por Rosito e cols.<sup>11</sup>. Nesse trabalho os autores, estudando a textura da cromatina nuclear de lesões neoplásicas de reto, determinaram a partir da avaliação de 93 das mais de 400 características do sistema TICAS<sup>55</sup>, as 11 características cariométricas com maior poder de discriminação entre células normais e neoplásicas permitindo, pela primeira vez, a obtenção da assinatura digital específica para o adenocarcinoma primário de reto. Além disso, também ficou demonstrado que as características nucleares destas assinaturas digitais diferiam daquelas das assinaturas digitais do tecido normal de reto. Dentre as 11 características mais discriminantes, o estudo ainda possibilitou a determinação das três características mais importantes para a assinatura digital do adenocarcinoma primário de reto, a saber: a DOT (densidade óptica total), a área

e a granularidade. Ademais, todas as assinaturas nucleares médias do adenocarcinoma primário de reto, quando categorizadas pelo estadiamento de Dukes-Turnbull<sup>24</sup> apresentaram-se estatisticamente diversas das assinaturas médias do tecido de reto normal. Ao mesmo tempo, verificou-se que tumores no estágio B de Dukes-Turnbull<sup>24</sup> diferiram, não só do tecido normal como também das assinaturas nucleares médias dos demais estágios constituindo, desta forma, um novo parâmetro para avaliação complementar do tumor além de demonstrar relacionar-se diretamente com o prognóstico. Quando estes resultados foram submetidos à análise multivariada de Cox, além do estadiamento de Dukes-Turnbull, a DOT foi a característica nuclear que apresentou o melhor poder prognóstico de desfecho para óbito em 5 anos.

O estudo determinou com precisão as características da textura da cromatina nuclear do adenocarcinoma primário de reto através da definição das suas características nucleares e da assinatura digital. No entanto, para obtenção destas informações foi necessária a utilização do espécime cirúrgico perdendo-se, com isso, muito da possível aplicabilidade clínica e da capacidade prognostica do método. O presente estudo procurou determinar se as biópsias, obtidas de colonoscopias prévias à cirurgia, apresentariam em seus núcleos, características similares à textura nuclear observadas nas peças cirúrgicas das quais foram originadas. Pois, assim sendo, poderiam servir como fator auxiliar no planejamento clínico-cirúrgico do adenocarcinoma primário de reto.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do estudo foi analisado um conjunto de 7113 núcleos de tecido de reto oriundos de amostras de pacientes submetidos à colonoscopia com biópsia de reto no Serviço de Proctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) que resultaram no diagnóstico de adenocarcinoma primário ou tecido sadio e que pertencem ao banco de dados atualizado do grupo de pesquisa de Cirurgia Oncológica Gastrointestinal (Southern Surgical Oncology Group; COG/SSOG) do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, utilizado em projetos de pesquisas anteriores do COG/SSOG e efetuados nessas amostras.

Inicialmente, foram buscados no Serviço de Arquivo Médico e Informações em Saúde do HCPA (SAMIS/HCPA) os laudos das biópsias dos 51 pacientes operados por adenocarcinoma de reto no estudo prévio<sup>11</sup>. Dos 25 laudos encontrados, com diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma de reto, foram recuperados os blocos de parafina de 14 casos (12 do arquivo do Serviço de Patologia do HCPA e 2 de laboratórios externos), tendo dois casos sido excluídos (1= radioterapia; 1= tecido não retal) após re-análise das lâminas. Assim, restaram 12 casos que originaram os núcleos capturados correspondentes ao grupo do banco das biópsias.

Os 7113 núcleos estavam assim distribuídos: (a) 6002 núcleos do estudo prévio<sup>11</sup> separados em 3636 núcleos extraídos das lâminas das peças cirúrgicas do total de 51 casos de adenocarcinoma de reto que constituíam o grupo de tumores do banco original abreviadamente chamado de grupo de peças cirúrgicas do banco e 2366 núcleos oriundos de biópsias de tecido de reto sadio

de 22 casos investigados por queixas coloproctológicas constituindo o grupo controle e, (b) 1983 núcleos divididos em 1111 núcleos capturados das lâminas dos 12 blocos de biópsias de lesões tumorais obtidas por colonoscopia no período pré-operatório e denominadas de grupo biópsias e 872 núcleos correspondendo aos 12 casos (dentre os 51 casos do grupo de tumores do banco original) que tiveram os blocos de biópsias recuperados constituindo o grupo das peças de biópsias do banco original e denominado, a partir de então, de grupo de peças cirúrgicas das biópsias.

Dentro de cada grupo, os núcleos de cada caso, foram estadiados pela classificação de Dukes-Turnbull<sup>24</sup>.

Os núcleos obtidos nesses quatro grupos possibilitaram o estudo das características da textura nuclear e foram comparados entre si.

As variáveis principais analisadas foram a assinatura digital (assinatura nuclear) e a assinatura nuclear média das características nucleares dos quatro grupos.

Para a obtenção das imagens utilizadas no estudo foram confeccionadas lâminas obtidas a partir de cortes homogêneos de 5 µm de espessura retirados dos blocos de parafina das biópsias e das peças cirúrgicas sendo coradas pela técnica de hematoxilina e eosina de Mayer<sup>69</sup> e utilizados para análise histológica com localização das áreas de adenocarcinoma de reto.

A seguir, as áreas escolhidas foram visualizadas num sistema de captura de imagens (vídeofotômetro) dotado dos seguintes componentes<sup>70</sup>:

**Componente óptico:** microscópio óptico convencional marca Olympus, dotado de sistema de iluminação Koehler, e condensador Abbé e lentes objetivas plano-apocromáticas de 20 e 50 aumentos. O microscópio conta com

um fototubo, óptica plana com amplificação de 1x e lentes de projeção com 10 aumentos determinando resoluções finais de 200 e 500x.

**Dispositivo CCD:** ao fototubo do microscópio Olympus foi acoplada uma videocâmara Sony CCD DXC 970 MD para captura de imagens com magnificação de 200 e 500x. Durante a captura as imagens eram monitoradas por monitor de vídeo Sony.

**Placas Digitalizadoras De Imagem:** foi utilizada placa de captura IMAGEPROPLUS, de captura estática, gerando quadros de 640 x 480 elementos de imagem, cores de 24 bits ou 256 tons de cinza, sendo estas imagens gravadas em disco rígido, com cópias de segurança em CD-ROM gravável.

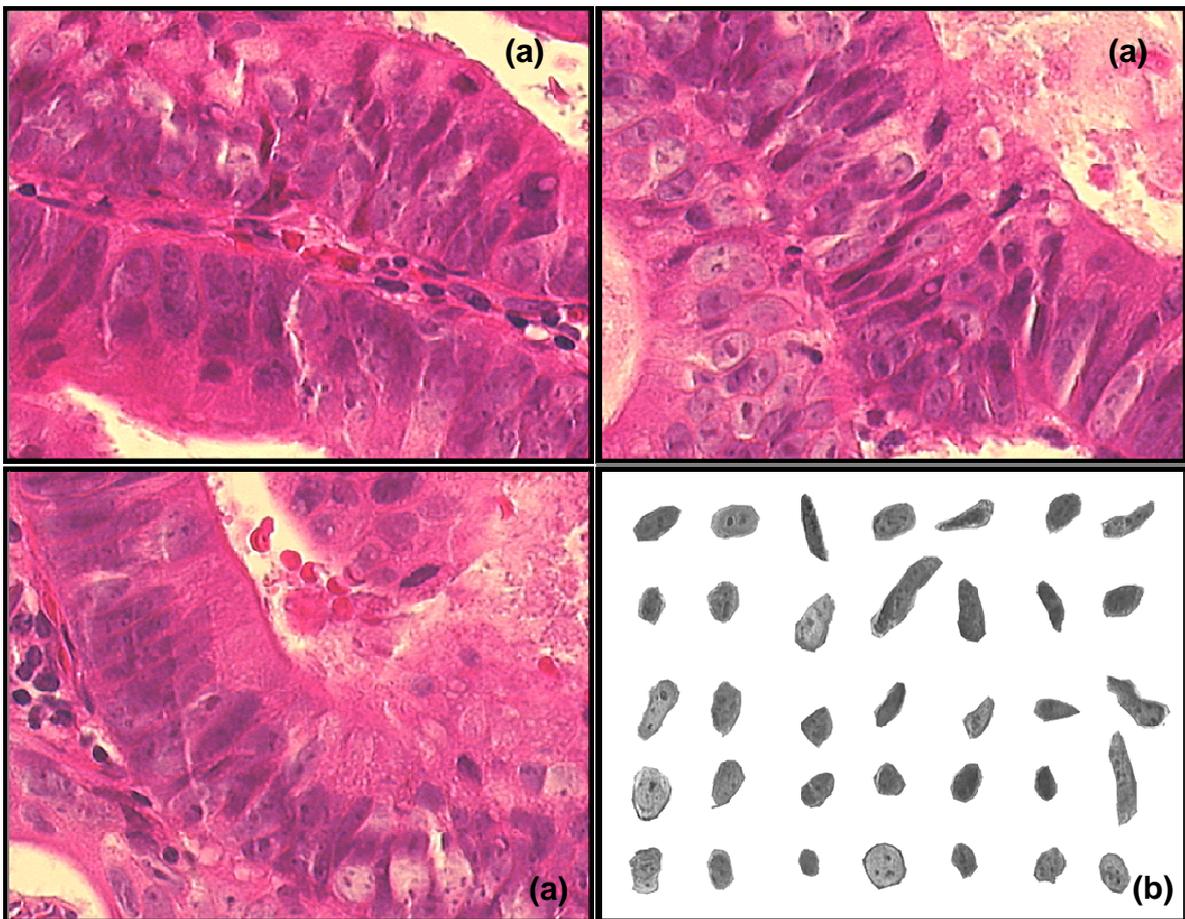
**Microcomputador:** a placa de captura de imagem foi conectada ao computador padrão IBM-PC com processador Intel Pentium II de 450 MHz, 128MB de memória RAM, disco rígido de 14 GB e monitor de 17" com sistema operacional Microsoft Windows 98.

A imagem digital obtida neste processo é o produto da divisão da imagem em uma matriz finita de duas dimensões composta por elementos de imagens ou pixels. Este formato é criado pela conexão da placa digitalizadora ao elemento gerador de imagens (CCD – charge coupled device). A placa define o valor da tonalidade de cada elemento de imagem (pixel)<sup>71</sup>.

As imagens selecionadas foram capturadas e segmentadas por observador treinado em citologia e arquivadas, sem compactação para preservação da imagem de forma integral, no disco rígido do computador e em cópias de CD-R. Em média, foram escolhidos e capturados 10 a 15 campos das lâminas de HE de cada caso dos grupos estudados. A extração dos núcleos foi realizada com o programa Corel Draw 9 sendo estes

conjuntos preservados, separadamente, em disco rígido e *media* removível criando-se arquivos representativos de cada caso para posterior análise das características da textura nuclear dos mesmos isoladamente

A Figura 1 mostra exemplos de imagens de campos microscópicos capturados e de um fragmento de conjunto de núcleos segmentados utilizados para a leitura das características nucleares.



**Figura 1. (a) Imagens digitais de campos microscópicos de biópsias de adenocarcinoma de reto (HE, 500x); (b) fragmento de imagem de arquivo de núcleos segmentados de adenocarcinoma de reto.**

Para extração das características da textura nuclear dos arquivos selecionados utilizou-se o software Image-Pro Plus, versão 6.0.0.260 Media Cybernetics Inc, Silver Springs, EUA baseado no sistema TICAS<sup>55</sup> do Optical Sciences Center of University of Arizona, Tucson AZ, USA. As características escolhidas para serem analisadas foram aquelas que já haviam sido previamente determinadas como significativas e independentes para o adenocarcinoma de reto<sup>72</sup> quais sejam: área, DOT e granularidade. Este programa aplicado às características em questão originou valores, em unidades arbitrárias, gerando planilhas numéricas específicas para cada conjunto de núcleos representativos dos casos estudados.

A partir destes resultados foram elaboradas as variáveis estudadas:

Assinatura nuclear (assinatura digital): apresentada graficamente por histograma com o valor médio de z de cada uma das três características analisadas da cromatina nuclear (área, DOT e granularidade) e que representa a organização da cromatina nuclear obtida pela análise digital de imagens de microscopia óptica convencional<sup>71</sup> comparadas a um padrão de normalidade. Isto permite ao observador reconhecer padrões e tendências de distribuição de valores. Por convenção do Sistema TICAS, valores negativos de z foram excluídos na construção da assinatura nuclear e sucedâneos.

Assinatura nuclear média (da lesão, de padrão histológico): é a média aritmética de todos os valores de escore z das três características nucleares estudadas gerando um valor que sumariza globalmente o histograma da assinatura nuclear. A partir do mesmo é possível a avaliação de semelhanças ou diferenças entre as assinaturas nucleares.

Para o estabelecimento destas variáveis foi necessário calcular-se a distância média padronizada da população normal (DMPN) de cada núcleo e do conjunto de núcleos de cada caso considerando-se, em cada uma das três características nucleares estudadas, a diferença ou desvio em relação a uma referência de normalidade (grupo controle). A sigla DMPN representa o escore z médio de cada uma das características nucleares mensuradas. Esta diferença é definida, para a característica cariométrica de cada núcleo ou do conjunto de núcleos, a partir da diferença absoluta entre aquela característica e o valor determinado para o conjunto de células normais estudadas, dividido pelo desvio padrão do grupo controle. Os valores das ordenadas dos histogramas nucleares passam a ser valores z expressos em unidades padronizadas de distância da população normal. A DMPN de referência, o grupo controle, tende a ser igual a zero.

Na análise descritiva das variáveis foram calculadas as médias, desvios-padrão, valores máximos e mínimos onde aplicáveis.

Para comparação das características nucleares entre os grupos foram usados nas variáveis quantitativas, em situação de assimetria, os testes Wilcoxon rank test, teste dos Sinais e o teste U de Mann-Whitney dependendo se as amostras eram pareadas ou independentes.

Os grupos tiveram a intensidade de suas diferenças avaliadas pela estimativa do tamanho de efeito padronizado (TEP)<sup>73-75</sup> que estabelece os seguintes parâmetros de tamanho de efeito: 0,2 pequeno; 0,5 médio e  $\geq 0,8$  grande.

Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Os dados foram processados pelos programas de computador Microsoft Excel 2002 e SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows, versão 16. Os histogramas foram originados no Microsoft Excel 2002.

O presente estudo foi avaliado pela Comissão de Ética do HCPA, Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG/HCPA), tendo sido aprovado.

## 5. RESULTADOS

Os 12 blocos de parafina das biópsias colonoscópicas recuperados corresponderam a 7 homens e 5 mulheres que foram submetidos aos seguintes procedimentos cirúrgicos: 6 amputações abdominoperineais e 6 retossigmoidectomias anteriores e apresentaram taxa de sobrevida em 5 anos de 41,7% (5 casos). A sobrevida no grupo peças cirúrgicas do banco foi de 45,1%.

A amostra de 7113 núcleos foi obtida a partir de 85 arquivos separados que apresentaram média (dp) de 83,68 (18,4) núcleos capturados por caso. Deste total, 4747 corresponderam a núcleos de adenocarcinoma de reto que, de acordo com a classificação de Dukes-Turnbull<sup>24</sup>, estão distribuídos nos seguintes grupos: (a) lâminas do grupo das biópsias; (b) lâminas do grupo das peças cirúrgicas das biópsias e (c) lâminas do grupo das peças cirúrgicas do banco os quais, juntos com as lâminas dos controles, estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Distribuição dos grupos de lâminas avaliadas**

Grupo (n)	Estadiamento de Dukes-Turnbull (núcleos)				
	A	B	C	D	Total
<b>Biópsias</b> (12)	231	548	90	242	1111
<b>Peças cirúrgicas das biópsias</b> (12)	143	449	70	210	872
<b>Peças cirúrgicas do banco</b> (51)	710	893	1505	528	3636
<b>Controles</b> (22)					2366
Subtotal	1084	1890	1665	980	7113*

\* extraídos os núcleos do grupo peças cirúrgicas das biópsias já contabilizados no grupo das peças cirúrgicas

A partir da avaliação das características nucleares: área, DOT e granularidade foi criada a Tabela 2 que apresenta os dados descritivos da amostra e suas comparações.

**Tabela 2. Características das amostras e suas comparações**

<b>Grupos</b>	<b>Biópsias</b>	<b>Controles</b>	<b>Peças cirúrgicas das</b>	<b>Peças cirúrgicas do</b>
<b>Características</b>	<b>média (dp)</b>	<b>média (dp)</b>	<b>biópsias</b>	<b>banco</b>
			<b>média (dp)</b>	<b>média (dp)</b>
Área	699,8395 (186,8596)	500,605 (63,7026)	1280,4964 (240,4021)	1203,6625 (250,5084)
DOT	104129,24 (32188,6889)	34597,43 (4580,5361)	54552,94 (59155,9220)	48053,0289 (51523,2667)
Granularidade	0,0141 (0,0107)	0,0011 (0,0014)	0,0336 (0,0447)	0,0203 (0,0328)
<b>Comparação com o grupo Biópsias * , ** (p)</b>				
Área		0,012 <sup>*</sup>	0,000 <sup>**</sup>	0,000 <sup>*</sup>
DOT		0,000 <sup>*</sup>	0,110 <sup>**</sup>	0,012 <sup>*</sup>
Granularidade		0,003 <sup>*</sup>	0,470 <sup>**</sup>	0,569 <sup>*</sup>

\* Wilcoxon Signed Ranks Test; \*\* Mann-Whitney

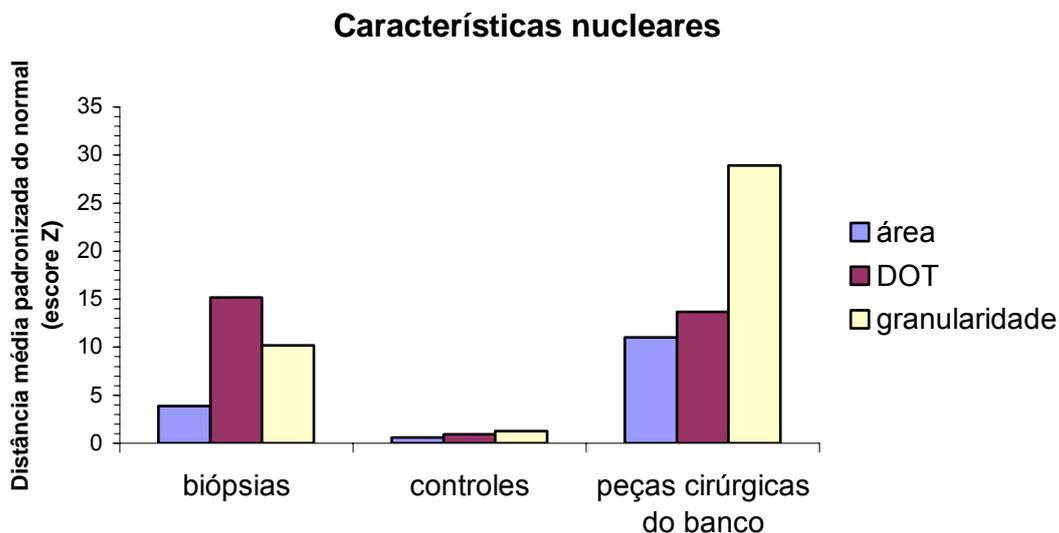
A Tabela 3 apresenta a avaliação, pelo TEP, da intensidade das diferenças observadas entre as características.

**Tabela 3. Comparação das características pelo TEP**

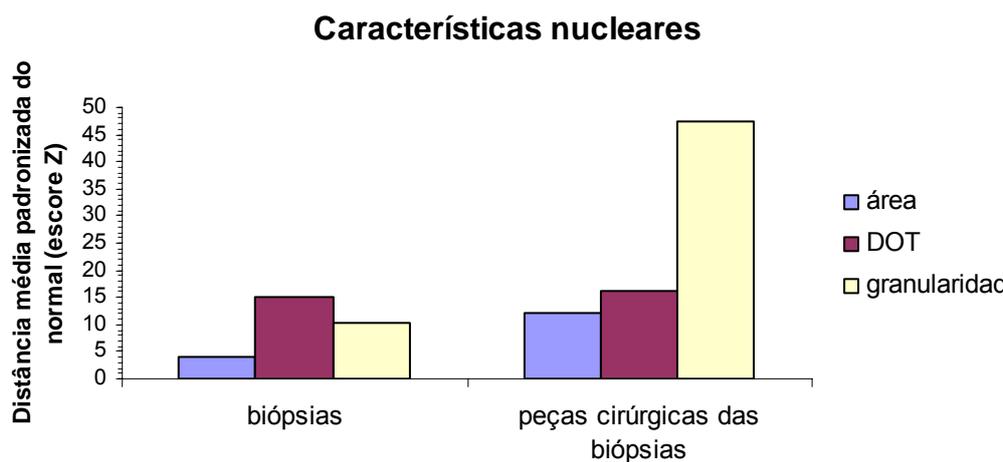
<b>Características</b>	<b>Biópsias x</b>	<b>Biopsias x Peças cirúrgicas</b>	<b>Biópsias x Peças cirúrgicas</b>
	<b>Controles (p)</b>	<b>das biópsias (p)</b>	<b>do banco(p)</b>
Área	1,64 (0,000)	0,26 (0,515)	2,27 (0,000)
DOT	1,31 (0,003)	0,10 (0,801)	1,03 (0,014)
Granularidade	1,26 (0,001)	0,06 (0,884)	0,02 (0,948)

TEP- tamanho do efeito padronizado

As Figuras 2, 3 e 4 apresentam os histogramas das assinaturas nucleares que foram elaborados para os grupos das biópsias, dos controles, das peças cirúrgicas das biópsias e das peças cirúrgicas do banco em suas várias comparações.

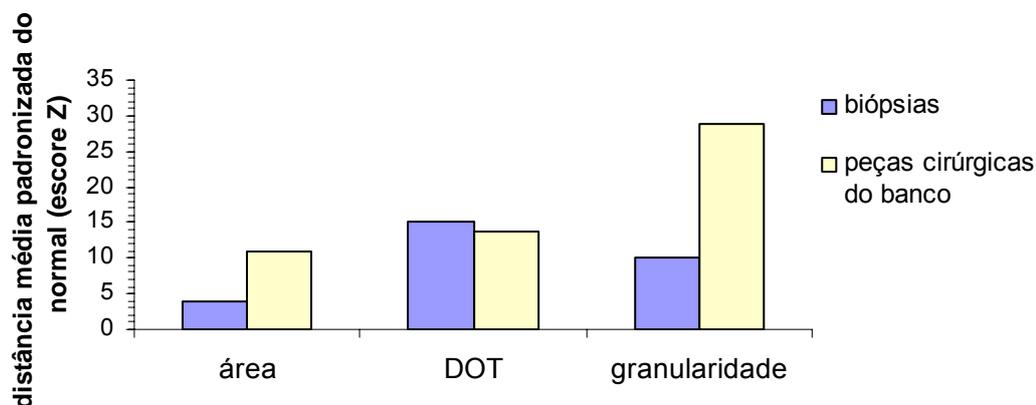


**Figura 2. Assinatura nuclear dos grupos biópsias, controles e peças cirúrgicas do banco**



**Figura 3. Assinatura nuclear dos grupos biópsias e peças cirúrgicas das biópsias**

### Características nucleares



**Figura 4. Assinatura nuclear dos grupos biópsias e peças cirúrgicas do banco**

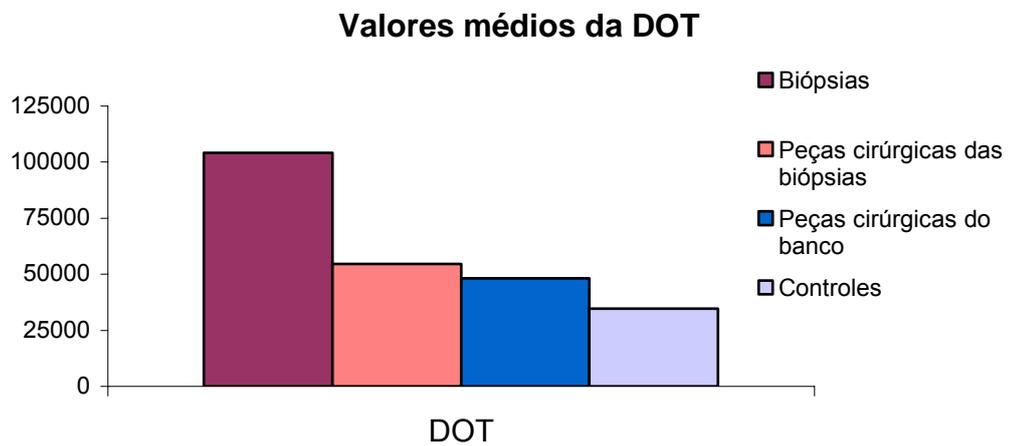
Com os valores do escore Z de cada característica foram calculadas as assinaturas nucleares médias que caracterizam os grupos e estão mostradas com suas comparações, na Tabela 4.

**Tabela 4. Assinatura nuclear média de cada grupo**

Grupos	assinatura nuclear média (dp)	Comparação com o grupo Biópsias (p)
Biópsias	10,095 (7,596)	
Controles	0,864 (0,856)	0,000
Peças cirúrgicas das biópsias	22,004 (20,757)	0,003
Peças cirúrgicas do banco	16,115 (15,290)	0,672

Wilcoxon Signed Ranks Test

A Figura 5 apresenta a variação da característica DOT entre os grupos estudados observando-se que o maior valor ocorreu no grupo das biópsias.



**Figura 5. Distribuição dos valores médios da DOT por grupo**

## 6. DISCUSSÃO

A evolução do conhecimento médico, com o entendimento cada vez maior dos processos da carcinogênese<sup>22</sup> e o acréscimo de novas tecnologias<sup>7</sup>, muito tem contribuído para o diagnóstico e tratamento do câncer de reto. No entanto, o impacto deste progresso sobre a mortalidade da doença está distante do desejado e a busca por métodos que auxiliem no seu manejo se mantém atual. Dentre os vários fatores prognósticos o estadiamento tumoral, por Dukes e suas modificações, ainda permanece como um dos mais importantes fatores de risco independente na predição de desfechos clínicos.

A análise da textura da cromatina nuclear do adenocarcinoma de reto com a criação da assinatura digital, sua relação com o estadiamento de Dukes-Turnbull<sup>24</sup> e possíveis implicações prognósticas foram introduzidas por Rosito e cols.<sup>72,76</sup>. Tais achados permitem a presunção de que se as características da textura da cromatina nuclear de biópsias colonoscópicas de adenocarcinoma de reto sejam semelhantes às mesmas características da textura da cromatina nuclear dos tumores vistos na coorte examinada por Rosito e cols.<sup>11</sup>, esses resultados poderiam ser utilizados como fator prognóstico no planejamento do manejo do câncer de reto.

Com o objetivo de avaliar se as características nucleares daquelas biópsias eram diferentes das mesmas características de tecido de reto normal foram estudadas as características nucleares dos 1111 núcleos do grupo biópsias (12 casos) e 2366 núcleos do grupo controle (22 casos). Na comparação das médias das três características (área, DOT e granularidade) de cada grupo verificou-se, que todas apresentaram diferença estatística significativa como se

verifica na Tabela 2. Para avaliar a intensidade destas diferenças foi calculado o TEP<sup>73-75</sup> destas características em relação aos controles. Nas três comparações (área: 1,64; DOT: 1,26; granularidade: 1,31) o índice foi maior que 0,8 denotando, portanto, uma diferença substancial corroborada pelo valor do “p” que foi altamente significativo como se vê na Tabela 3. Após cálculo do “escore z” de cada característica foi possível a criação dos histogramas das assinaturas digitais dos conjuntos a fim de compará-los entre si e também com o histograma da assinatura digital do grupo peças cirúrgicas do banco conforme foi mostrado na Figura 2 permitindo, com isso, a visualização das diferenças encontradas nos testes anteriores.

Finalmente, foi elaborada a assinatura nuclear média dos dois grupos (biópsias e controles) demonstrando-se, novamente, que o grupo biópsias era estatisticamente diferente do grupo controle ( $p= 0,0000$ ) e que também não apresentava diferença estatística quando comparado com o valor desta variável no grupo peças cirúrgicas do banco ( $p= 0,6720$ ) como está mostrado na Tabela 4. Desta forma foi possível aceitar-se o primeiro pressuposto da hipótese conceitual de que as características nucleares e a assinatura digital do grupo biópsias são diferentes, para aquelas características, do grupo controle.

Para testar a hipótese de que as características nucleares e as assinaturas digitais do grupo biópsias (1111 núcleos, 12 casos) são semelhantes, nestas variáveis, ao grupo peças cirúrgicas das biópsias (872 núcleos, 12 casos), compararam-se as médias das três características analisadas. Não houve diferença estatística significativa em duas características, DOT e granularidade, enquanto que em relação à área esta diferença foi significativa. A partir do cálculo do “escore z” de ambos os grupos, foram plotados os histogramas das

assinaturas digitais conforme mostra a Figura 3. Quando se compararam as assinaturas nucleares médias entre os grupos (biópsias: 10,095 vs peças cirúrgicas das biópsias: 22,004) observou-se diferença estatisticamente significativa entre elas ( $p=0,003$ ). Explorando-se o porquê desta diferença verificou-se que no cálculo do “escore z” as características DOT e granularidade, do grupo peças cirúrgicas das biópsias, tiveram excluídos metade de seus valores o que deve, seguramente, ter desequilibrado a amostra ao reduzir em 50% um dos grupos. Na determinação da “intensidade da diferença” pelo TEP (Tabela 3), verificou-se que nas três comparações as variáveis estudadas não diferiram estatisticamente entre si e mais, os valores dos índices foram sempre próximos ou abaixo de 0,2 indicando um mínimo tamanho de efeito o que sugere uma semelhança maior entre os grupos. Os resultados desta comparação permitem supor que, apesar da diferença estatística entre as médias da área, as três características estudadas e a assinatura digital do grupo das biópsias são representativas, nestas variáveis, do grupo de peças dos tumores das quais se originaram. A avaliação pelo TEP, que estima o tamanho do efeito destas diferenças, fortalece essa presunção.

Uma vez que o grupo biópsias mostrou ser representativo das peças destes tumores posteriormente ressecados, confrontou-se aquele grupo e o grupo peças cirúrgicas do banco. Na comparação das médias das características nucleares, a área e a DOT diferiram estatisticamente enquanto a granularidade não mostrou diferença. O valor médio da área foi, novamente, maior no grupo peças cirúrgicas do banco enquanto que o valor médio da DOT foi, também mais uma vez, maior no grupo das biópsias conforme se pode observar na Figura 5. A diferença observada nos valores da DOT possa ser talvez explicada porque a

distribuição dos tumores estágio B de Dukes-Turnbull nos grupos foi muito diferente entre si com 50% e 23,5% respectivamente o que pode ter enviesado esta comparação. Quando as variáveis foram analisadas pelo TEP os resultados foram semelhantes àqueles obtidos na comparação das médias. O TEP foi de 2,38 e 1,03 para a área e a DOT, índices estes maiores do que 0,8 confirmando a diferença entre os grupos. Já, em relação à granularidade, estas diferenças não foram observadas (TEP= 0,025; p= 0,95).

No entanto, após a construção dos histogramas das características nucleares para se determinar a assinatura digital verificou-se que estes diferiam, visualmente, apenas na granularidade como se vê na Figura 4. E quando as assinaturas nucleares médias foram calculadas e comparadas (Tabela 4), não houve diferença estatisticamente significativa (p= 0,6720).

Considerando que Rosito e cols.<sup>11</sup>, quando avaliaram as características área, DOT, granularidade e a assinatura nuclear média dos grupos, pelo modelo multivariado de Cox para o desfecho óbito em 5 anos, não encontraram diferença estatística para a área (p= 0,620) e, ao contrário, para a assinatura nuclear média houve considerável diferença estatística (p= 0,018) é razoável inferir-se que a área, nesta situação, parece não interferir no desfecho. Isto reforça, mais uma vez, a hipótese de que as assinaturas digitais das biópsias possam claramente apresentar equivalência às assinaturas digitais do grupo peças cirúrgicas do banco originais.

Portanto, a partir dos dados do presente estudo é possível inferir-se que existem evidências de que as características nucleares de biópsias colonoscópicas histologicamente caracterizadas como adenocarcinoma de reto são clara e consistentemente representativas das peças cirúrgicas

correspondentes ou do banco de dados original. Estes achados confirmam a hipótese conceitual permitindo a utilização pré-operatória desta avaliação no planejamento da abordagem do adenocarcinoma de reto.

As situações onde as diferenças foram marginais seguramente devem-se aos pequenos números amostrados o que poderá ser comprovado em estudos posteriores com maior número de casos em cada grupo.

## 7. CONCLUSÃO

A análise dos dados permite as seguintes definições:

As biópsias colonoscópicas, histologicamente caracterizadas como adenocarcinoma de reto, diferem estatisticamente pela análise das características nucleares, da assinatura digital e da assinatura nuclear média do grupo controle constituído de biópsias de tecido sadio de reto.

O grupo biópsias não apresentou diferença estatística, nas variáveis DOT e granularidade, quando comparado ao grupo peças cirúrgicas das biópsias. Ao mesmo tempo em que o TEP, ao medir a intensidade da diferença entre as variáveis, não foi estatisticamente distinto em nenhuma das três comparações.

Quando comparadas ao grupo peças cirúrgicas do banco, as biópsias colonoscópicas destas lesões constituintes do grupo biópsias não mostraram diferença estatisticamente significativa nas assinaturas nucleares médias.

Os resultados encontrados no presente estudo permitem concluir que existem evidências de que as biópsias colonoscópicas de tecido tumoral de reto, caracterizadas histologicamente como adenocarcinoma, representam com fidedignidade, por suas características nucleares, assinaturas digitais e assinatura nuclear média, os tumores de reto de onde foram extraídas. Isto permite a sugestão do uso destas informações na fase pré-operatória para melhor definição da abordagem do câncer de reto.

A determinação de valores de ponto de corte para o estabelecimento da sensibilidade e especificidade do método é função de um maior número de espécimes amostrados e poderá ser avaliado em estudos posteriores.

## 8. REFERÊNCIAS

- 1 Moreira LF, Dias GB, Bauermann FB, Linhares EL, Mercado C. Estudo retrospectivo do índice de mortalidade por câncer de cólon e de reto em Porto Alegre e no Rio Grande do Sul. *Proc XV JACAD* 1997;15:29-TLO38
- 2 Tjandra JJ, Kilkenny JW, Buie WD, Hyman N, Simmang C, Anthony T et al. The Standards Practice Task Force; The American Society of Colon and Rectal Surgeons. Practice parameters for the management of rectal cancer (revised). *Dis Colon Rectum*. 2005;48(3):411-23.
- 3 U.S. National Cancer Institute [homepage na Internet]. Bethesda: Colon and Rectal Câncer; [acessado em 2008 nov 12]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/colon-and-rectal>
- 4 Strother J, Billingsley KG, Hung AY, Blanke CD. Current Status of Colorectal Cancer Therapy. In: Faigel DO, Kochman ML, editores. *Endoscopic Oncology: Gastrointestinal Endoscopy and Cancer Management*, Springer; 2006. p. 273-285.)
- 5 Moreira LF, Hizuta A, Iwagaki H, Tanaka N, Orita K. Lateral lymph node dissection for rectal carcinoma below the peritoneal reflection. *Br J Surg* 1994; 81: 293-96.
- 6 Hermanek P, Wiebelt H, Staimmer D, Riedl S. Prognostic factors of rectum carcinoma-experience of the German Multicentre Study SGCRC. German Study Group Colo-Rectal Carcinoma. *Tumori*. 1995;81(3 Suppl):S60-4
- 7 Balch GC, De Meo A, Guillem JG. Modern management of rectal cancer: a 2006 update. *World J Gastroenterol*. 2006;12(20):3186-95
- 8 Pricolo VE, Finkelstein SD, Hansen K, Cole BF, Bland KI. Mutated p53 gene is an independent adverse predictor of survival in colon carcinoma. *Arch Surg* 1997;132:371-75.
- 9 Rex DK, Likhan M, Cummings O, Ulbright TM. Accuracy of pathologic interpretation of colorectal polyps by general pathologists in community practice. *Gastrointest Endosc* 1999;50:468-74.
- 10 Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T et al. Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer*. 1998;82(1):60-9
- 11 Rosito MA. Caracterização de núcleos celulares no adenocarcinoma primário de reto por análise de imagem digital. Tese de Doutorado. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, 2002
- 12 Bartels P, Da Silva V, D, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L, Bartels HG. Chromatin texture signatures in nuclei from prostate lesions. *Analyt Quant Cytol Histol* 1998;20:407-16.
- 13 Da Silva VD, Montironi R, Thompson D, Bartels H, Vaught L, Hamilton RW, Bartels P. Chromatin texture in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and early invasive carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999;21:113-20.
- 14 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005; 55: 74 – 108.
- 15 Jemal A, Siegels R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T et al. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96.
- 16 Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:925–943.
- 17 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007.)
- 18 Bond JH. Colon polyps and cancer. *Endoscopy* 1999;31:60-65.
- 19 Akiyama Y, Yagi OK, Ishikawa T, Nagasaki H, Saitoh K, Yuasa Y. Genetic alterations are frequent in APC but rare in the TGF-beta type II receptor gene in cancer in adenomas of colon. *Cancer Lett* 1998;125:89-96.
- 20 Yang HB, Chow NH, Sheu BS, Chan SH, Chien CH, Su IJ. The role of bcl-2 in the progression of the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Anticancer Res* 1999;19:727-30.
- 21 Goodman SR. Regulation of gene expression in: *Medical Cell Biology* 1994.
- 22 Pinho M. *Biologia Molecular do Câncer – Fundamentos para a prática médica*. Rio de Janeiro: Revinter; 2005.
- 23 Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932; 35: 323–32.

- 24 Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg* 1967; 166: 420–27.
- 25 Astler VA, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139: 846–52.
- 26 Tarta C, Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, Chiele-Neto C, da Silva VD. Angiogenesis in advanced colorectal adenocarcinoma with special reference to tumoral invasion. *Arq Gastroenterol*. 2002 39(1):32-8
- 27 Tarta C, da Silva VD, Teixeira CR, Prolla JC, Meurer L, Neto CC, Tanaka S. Digital image analysis and stereology of angiogenesis in polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas. *Anal Quant Cytol Histol*. 2004;26(4):201-6.
- 28 Geboes K, Ectors N, Geboes KP. Pathology of early lower GI cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19(6):963-78.
- 29 Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. Angiogenesis in colorectal cancer: prognostic and therapeutic implications. *Am J Clin Oncol*. 2006 ;29(4):408-17.
- 30 Rmali KA, Puntis MC, Jiang WG. Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2007 ;9(1):3-14.
- 31 Hurlstone DP, George R, Brown S. Novel clinical in vivo roles for indigo carmine: high-magnification chromoscopic colonoscopy. *Biotech Histochem*. 2007;82(2):57-71
- 32 Watanabe T, Muto T. Colorectal carcinogenesis based on molecular biology of early colorectal cancer with special reference to nonpolypoid (superficial) lesions. *World J Surg*. 2000 ;24(9):1091-7.
- 33 van Wyk R, Slezak P, Hayes VM, Buys CH, Kotze MJ, de Jong G et al. Somatic mutations of the APC, KRAS, and TP53 genes in nonpolypoid colorectal adenomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;27(2):202-8.
- 34 Umetani N, Sasaki S, Masaki T, Watanabe T, Matsuda K, Muto T. Involvement of APC and K-ras mutation in non-polypoid colorectal tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2000;82(1):9-15.
- 35 Kanazawa T, Watanabe T, Nagawa H. Does early polypoid colorectal cancer with depression have a pathway other than adenoma-carcinoma sequence? *Tumori*. 2003;89(4):408-11.
- 36 Yoshida S, Ikehara N, Aoyama N, Shirasaka D, Sakashita M, Semba S et al. Relationship of BRAF mutation, morphology, and apoptosis in early colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23(1):7-13
- 37 Guadagni F, Graziano P, Roselli M, et al. Differential expression of a new tumor-associated antigen, TPL, during human colorectal cancer tumorigenesis. *Am J Pathol* 1999;154:993-9
- 38 Klump B, Nehls O, Okech T, Hsieh CJ, Gaco V, Gittinger FS et al. Molecular lesions in colorectal cancer: impact on prognosis? Original data and review of the literature. *Int J Colorectal Dis*. 2004; 19(1):23-42.
- 39 Jacks T & Weinberg RA. Cell cycle control and its watchman. *Nature* 1996;381:643.
- 40 Giovannetti E, Backus HH, Wouters D, Peters GJ. Functional inactivity and mutations of p53 differentially affect sensitivity to 5-fluorouracil and antifolate inhibitors of thymidylate synthase (TS) by altering TS levels in colorectal cancer cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 ;27(6):740-5.
- 41 Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, Chen FM, Lu CY, Huang TJ et al. APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. *Am Surg*. 2005 ;71(4):336-43
- 42 Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Lattuneddu A, Polifemo AM, Monti F et al. Mutation analysis of p53, K-ras, and BRAF genes in colorectal cancer progression. *J Cell Physiol*. 2005 Aug;204(2):484-8.
- 43 Popat S, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2005;41(14):2060-70.
- 44 Stoehlmacher J, Lenz HJ. Implications of genetic testing in the management of colorectal cancer. *Am J Pharmacogenomics*. 2003;3(2):73-88
- 45 Torsello A, Garufi C, Cosimelli M, Diodoro MG, Zeuli M, Vanni B et al. P53 and bcl-2 in colorectal cancer arising in patients under 40 years of age: distribution and prognostic relevance. *Eur J Cancer*. 2008;44(9):1217-22.
- 46 Dong Y, Wang J, Sheng Z, Li G, Ma H, Wang X et al. Downregulation of EphA1 in colorectal carcinomas correlates with invasion and metastasis. *Mod Pathol*. 2008 Nov 14 online)
- 47 Kato S, Iida S, Higuchi T, Ishikawa T, Takagi Y, Yasuno M et al. PIK3CA mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2007 Oct 15;121(8):1771-8.

- 48 Mizoshita T, Tsukamoto T, Inada KI, Hirano N, Tajika M, Nakamura T et al. Loss of MUC2 expression correlates with progression along the adenoma-carcinoma sequence pathway as well as de novo carcinogenesis in the colon. *Histol Histopathol.* 2007;22(3):251-60.
- 49 Kudo SE, Takemura O, Ohtsuka K. Flat and depressed types of early colorectal cancers: from East to West. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2008;18(3):581-93.
- 50 Park DH, Kim HS, Kim WH, Kim TI, Kim YH, Park DI et al. Clinicopathologic characteristics and malignant potential of colorectal flat neoplasia compared with that of polypoid neoplasia. *Dis Colon Rectum.* 2008;51(1):43-9.
- 51 Uronis JM, Herfarth HH, Rubinas TC, Bissahoyo AC, Hanlon K, Threadgill DW. Flat colorectal cancers are genetically determined and progress to invasion without going through a polypoid stage. *Cancer Res.* 2007; (24):11594-600.
- 52 Harvey NT, Ruzskiewicz A. Serrated neoplasia of the colorectum. *World J Gastroenterol.* 2007;28;13(28):3792-8.)
- 53 Beerenwinkel N, Antal T, Dingli D, Traulsen A, Kinzler KW, Vogelstein et al. Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Comput Biol.* 2007;3(11):e 225.
- 54 Goi T, Kawasaki M, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. Clinicopathological analysis of invading muscularis propria (T2) cancers < or =20mm in diameter. *Int Surg.* 2008;93(1):1-5.
- 55 Wied GL, Bartels PH, Bahr GF, Oldfield DG. Taxonomic intra-cellular analytic system (TICAS) for cell identification. *Acta Cytol* 1968;12: 180-204.
- 56 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. 177-85
- 57 Verhest A, Kiss R, d'Olne D, Larsimont D, Salmon I, de Launoit Y et al. Characterization of human colorectal mucosa, polyps, and cancers by means of computerized morphonuclear image analyses. *Cancer.* 1990 1;65(9):2047-54.
- 58 Montag AG, Bartels PH, Dytch HE, Lerma-Puertas E, Michelassi F, Bibbo M. Karyometric features in nuclei near colonic adenocarcinoma. Statistical analysis. *Anal Quant Cytol Histol.* 1991;13(3):159-67.
- 59 Hamilton PW, Bartels PH, Wilson RH, Sloan JM. Nuclear texture measurements in normal colorectal glands. *Anal Quant Cytol Histol.* 1995;17(6):397-405.
- 60 Bartels PH, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L, Bartels HG. Nuclear chromatin texture in prostatic lesions. II. PIN and malignancy associated changes. *Anal Quant Cytol Histol.* 1998;20(5):397-406.
- 61 Ferrer-Roca O, Pérez Gómez JA, Estévez M. Chromatin texture from hematoxylin stained thyroid lesions. *Anal Cell Pathol.* 1998;17(4):209-17
- 62 Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-8.
- 63 Weyn B, Tjalma W, Van De Wouwer G, Van Daele A, Scheunders P, Jacob W et al. Validation of nuclear texture, density, morphometry and tissue syntactic structure analysis as prognosticators of cervical carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2000;22(5):373-82.
- 64 Garcia FA, Davis JR, Hatch K, Alberts DS, Thompson D, Bartels PH. Karyometry in endometrial adenocarcinoma of different grades. *Anal Quant Cytol Histol.* 2002 Apr;24(2):93-102.
- 65 Bersch VP, da Silva VD, Osvaldt AB, da Costa MS, Rohde L, Mossmann D. Digital karyometry in pancreatic adenocarcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2003;25(2):108-14.
- 66 Huisman A, Ploeger LS, Dullens HF, Poulin N, Grizzle WE, van Diest PJ. Development of 3D chromatin texture analysis using confocal laser scanning microscopy. *Cell Oncol.* 2005;27(5-6):335-45.
- 67 Alberts DS, Einspahr JG, Krouse RS, Prasad A, Ranger-Moore J, Hamilton P et al. Karyometry of the colonic mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(12):2704-16
- 68 Adam RL, Leite NJ, Metze K. Image preprocessing improves Fourier-based texture analysis of nuclear chromatin. *Anal Quant Cytol Histol.* 2008;30(3):175-84.
- 69 Steven A. The haematixilins. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and Practice of Histological Techniques.* 3 rd ed. London: Churchill Livingstone; 1990. p.107-18
- 70 Bartels P, Thompson D. The video photometer. In: Marchevsky A, Bartels PH, editors. *Image analysis: a primer for pathologists.* New York: Raven Press; 1994.p. 29-56.
- 71 Da Silva VD. Caracterização de lesões e núcleos celulares neoplásicos por método de Assinatura Digital. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre;RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.

- 72 Rosito MA, Moreira LF, da Silva VD, Damin DC, Prolla JC. Nuclear chromatin texture in rectal cancer. Relationship to tumor stage. *Anal Quant Cytol Histol.* 2003; 25(1): 25-30.
- 73 Cohen, J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). New Jersey: Lawrence Erlbaum:1988.
- 74 McGraw, K. O., & Wong, S. P. A common language effect-size statistic. *Psychological Bulletin* 1992; 111: 361-5.
- 75 Will G Hopkins *A New View of Statistics : Effect magnitudes* [homepage na internet] atualização 2002. [acesso em 2008 jan 10] disponível em: <http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html>
- 76 Rosito MA, Damin DC, Moreira LF, da Silva VD, Prolla JC. Nuclear chromatin texture in rectal carcinoma. Prognostic value. *Anal Quant Cytol Histol.* 2003; 25(4): 215-20.

## ANEXO 1 - ARTIGO

### **DIGITAL SIGNATURE ON BIOPSIES OF PRIMARY ADENOCARCINOMA OF THE RECTUM**

Amaral R, Rosito MA, da Silva VD, Damin DC, Prolla JC, Amaral JT, Moreira LF

**Background:** Our previous studies have demonstrated that digital signature can characterize rectal cancer patterns on nuclei captured from surgical specimens showing an independent prognostic value for clinical outcomes.

**Objective:** To determine the feasibility of preoperatively predicting digital signature patterns of surgical specimens from rectal cancer based on digital signature obtained from biopsy sample counterparts.

**Study design:** High-resolution imagery of 7113 nuclei was digitally recorded from 22 biopsy samples of normal rectal tissues and from 51 surgical specimens of rectal cancer (including 12 biopsy samples counterparts). The three main characteristics (area, optical density and clumpness) descriptive of the spatial and statistical distribution of nuclear texture for rectal cancer were computed for each nucleus according to TICAS system for cell identification. From this database tumor biopsies (biopsy), biopsy surgical specimen counterparts (biopsy specimen), surgical specimens of the whole database bank (surgical specimen) and normal rectal biopsies (controls) were compared.

**Results:** Digital signature and average nuclear signature ( $P= 0.000$ ) of the tumor biopsy group were significantly different from controls. When nuclear characteristics and digital signatures were compared between the biopsy and the biopsy specimen groups, the OD and clumpness characteristics ( $P= 0.11$ ;  $P= 0.47$ ) as well as the standardized difference (effect-size) have not shown any statistical difference.

Also, when comparing the average nuclear signatures of the surgical specimen group with the tumor biopsy group no statistical difference was observed.

**Conclusion:** The nuclear characteristics of the digital signatures and the average nuclear signatures of biopsies, histologically characterized as rectal cancer, can consistently represent the surgical specimen counterparts and can be used as an additional preoperative prognostic factor.

**Keywords:** nuclear characteristics; rectum, adenocarcinoma; rectal cancer biopsy; chromatin texture; digital signature; prognosis.

## **Introduction**

The colorectal carcinoma is one of the most common malignant tumors in the western world, being the third cause of death in these continents and showing the rectal site in approximately 25% to 30% of the cases. Even with the modern technology for prognostic evaluation, the preoperative clinical staging is of limited value due to the reliability of the noninvasive methods keeping assessment by the TNM or the Dukes staging and its modifications (Turnbull, Astler-Coller) as the most important independent prognostic factors.<sup>1,2</sup>

Colorectal carcinogenesis depends upon interaction between several factors<sup>3-6</sup>. The process starts with changes in cell structure and function that are not always detected until disease becomes clinically evident.

Our previous studies have demonstrated that digital signature, obtained from surgical specimens, has shown independent prognostic value for clinical outcomes and depicted nuclear area, total optic density (OD) and clumpness as the main characteristics of this signature<sup>7,8</sup>. These findings, can disclose nuclei

changes long before become visually identifiable on light microscopy and could be used in the preoperative assessment with the purpose to plan the treatment approach. The digital signature technique, evaluates the nuclear texture characteristics of cells through digitalized image creating a histogram that represents a neoplastic lesion and it is distinct from normal tissue<sup>9,10</sup>. The feasibility of these results is however, restrained by the need of getting trapped to a surgical specimen in order to determine the digital signature.

Therefore, considering the same nuclear characteristics previously established by Rosito et al. as of prognostic value in rectal cancer, in this study we attempted to demonstrate that the digital signature of preoperative colonoscopic tumor biopsies would resemble the digital signature of surgical specimen counterparts, i. e., from resected tumors where those biopsies were taken from.

## **Materials and Methods**

A total of 7113 nuclei obtained from 22 biopsy samples of normal rectal tissues and surgical specimens of 51 cases of rectal adenocarcinoma (including 12 preoperative colonoscopic biopsies of such cases) from the Colon and Rectum Unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre University Hospital and belonging to a database bank from the Southern Surgical Oncology Group (SSOG), Post-Graduate Program of Medicine: Surgical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil were studied. From this database four groups were defined: a tumor biopsy (preoperative colonoscopic tumor biopsies), a biopsy specimen (surgical specimen counterpart from biopsies),

a surgical specimen (whole surgical specimen from database) and a control group (normal rectal tissue used as controls).

Tumors were classified into 4 stages according to Dukes' classification as modified by Turnbull et al.<sup>11</sup>, where Dukes A stage indicates tumor limited to the rectal wall; B, tumor extending into perirectal fat; C, tumor metastasis to lymph nodes; D, incurable disease due to distant spread or surrounding organ extension<sup>11</sup>. The number of cases and nuclei distribution according to Dukes-Turnbull staging for the four groups are shown in the Table 1.

**Table 1.** Distribution of Nuclei according to Dukes-Turnbull staging

Group (n)	Dukes-Turnbull staging (nuclei)				
	A	B	C	D	Total
<b>Tumor biopsy</b>	(12) 231	548	90	242	1111
<b>Biopsy specimen</b>	(12) 143	449	70	210	872
<b>Surgical specimen</b>	(51) 710	893	1505	528	3636
<b>Controls</b>	(22)				2366
<b>Subtotal</b>	1084	1890	1665	980	7113*

\* excluding the nuclei of the biopsy specimen group already counted in the surgical specimen group

The digital signature technique for this assessment was already published elsewhere<sup>10</sup>. Briefly, histologic sections were cut into 5 μm and stained with hematoxylin and eosin (H&E) under carefully controlled conditions. High-power images were recorded on a microscope (Olympus BX60, Tokyo, Japan) equipped with planapochromatic oil immersion objectives (500 x magnification) and a Sony (Parkridge, New Jersey, U.S.A.) DXC 970 MD 3-chip color CCD videocamera. Sites to be investigated were interactively selected, and

approximately 85 nuclei from each case were recorded on an IBM computer (Intel Pentium II, Santa Clara, CA,U.S.A.) to be analyzed by a feature extraction program. An interference filter with maximum bandpass at 610nm was used to enhance contrast of H&E-stained sections. The relay optics provided a sampling density of 6 pixels/ $\mu\text{m}$ .

The three main characteristics (area, OD and clumpness) descriptive of the spatial and statistical distribution of nuclear texture were computed for each nucleus according to the taxonomic intra-cellular analytic system for cell identification (TICAS) as previously described<sup>12</sup>. The main variables analyzed were the digital (nuclear signature) and the average nuclear signature. To accomplish these features, for each group, the standardized mean score (z score) of each nucleus and for the set of nuclei from the normal rectal tissue biopsies was calculated as previously determined<sup>9,10</sup>. All feature values were given in arbitrary relative units. Data were expressed as mean, standard deviation (sd) and z values. Comparisons of nuclear characteristics, digital signature and average nuclear signature among the groups were performed by Wilcoxon rank test, Mann-Whitney *U* test and Signs test where applicable<sup>13</sup>. The strength of the relationship between two variables was measured by calculating the standardized difference of means (effect-size; ES)<sup>14-16</sup>. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant for a 95% confidence interval. The study was performed with the approval of the Ethics and Scientific Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre University Hospital.

## Results

The mean values of the three main nuclear characteristics (area, OD and clumpness) and the comparisons by group are shown in Table 2.

**Table 2. Means of Sample Characteristics by the studied groups**

<b>Group Features</b>	<b>Tumor Biopsy</b> mean (sd)	<b>Control</b> mean (sd)	<b>Biopsy Specimen</b> mean (sd)	<b>Surgical Specimen</b> mean (sd)
Area	699.8395 (186.8596)	500.605 (63.7026)	1280.4964 (240.4021)	1203.6625 (250.5084)
OD	104129.24 (32188.6889)	34597.43 (4580.5361)	54552.94 (59155.9220)	48053.0289 (51523.2667)
Clumpness	0.0141 (0.0107)	0.0011 (0.0014)	0.0336 (0.0447)	0.0203 (0.0328)
	<b>Comparison with tumor biopsy group<sup>*</sup>,<sup>**</sup></b>		<b>P value</b>	
Area		0.012*	0.000**	0.000*
OD		0.000*	0.110**	0.012*
Clumpness		0.003*	0.470**	0.569*

\* Wilcoxon Signed Ranks Test, \*\*Mann-Whitney

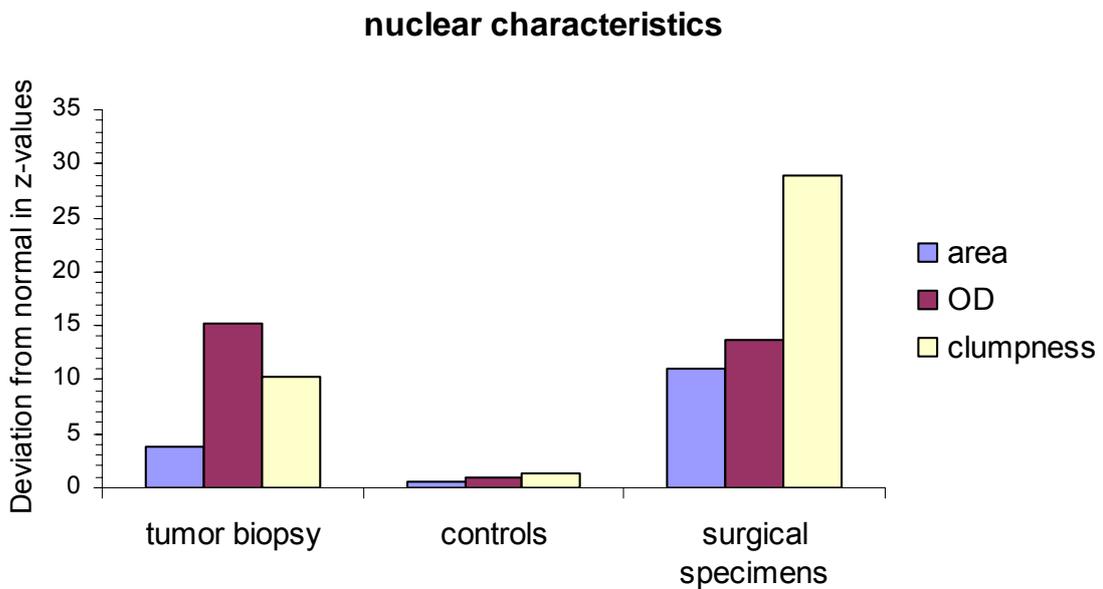
The strength of the relationship between two variables was measured by calculating the standardized difference of means (ES) is shown in Table 3.

**Table 3. Comparisons by the standardized difference of means (ES)**

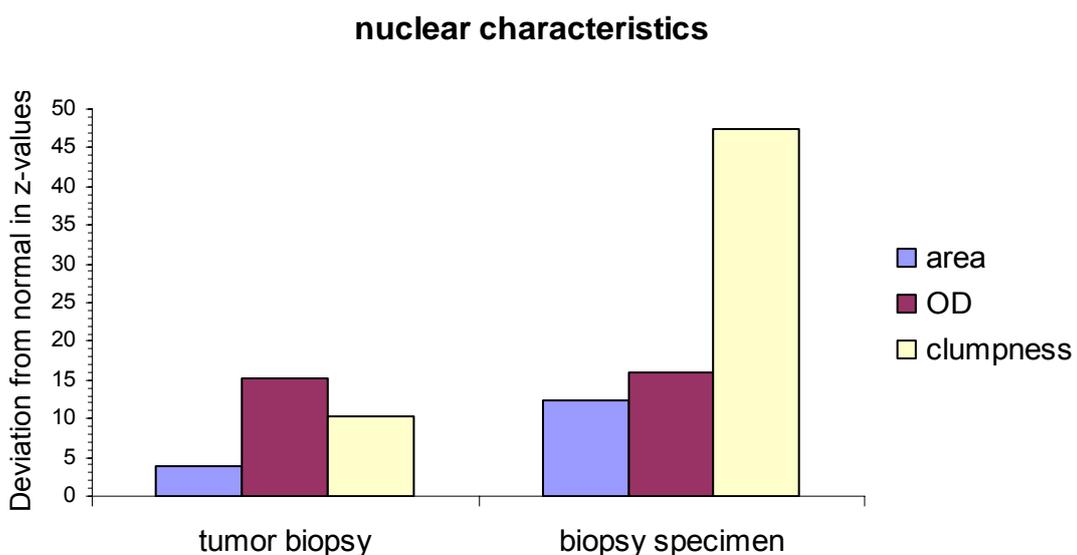
<b>Groups Features</b>	<b>Tumor biopsy</b>		
	<b>Controls (p)</b>	<b>Biopsy specimen (p)</b>	<b>Surgical specimen (p)</b>
Area	1.64 (0.000)	0.26 (0.515)	2.27 (0.000)
OD	1.31 (0.003)	0.10 (0.801)	1.03 (0.014)
Clumpness	1.26 (0.001)	0.06 (0.884)	0.02 (0.948)

ES; effect-size

Digital signatures derived from the three groups (tumor biopsy, controls and surgical specimen groups) are shown in Figure 1 as well as digital signature histograms comparing the tumor biopsy with the biopsy specimen and surgical specimen groups are shown in Figures 2 and 3, respectively.

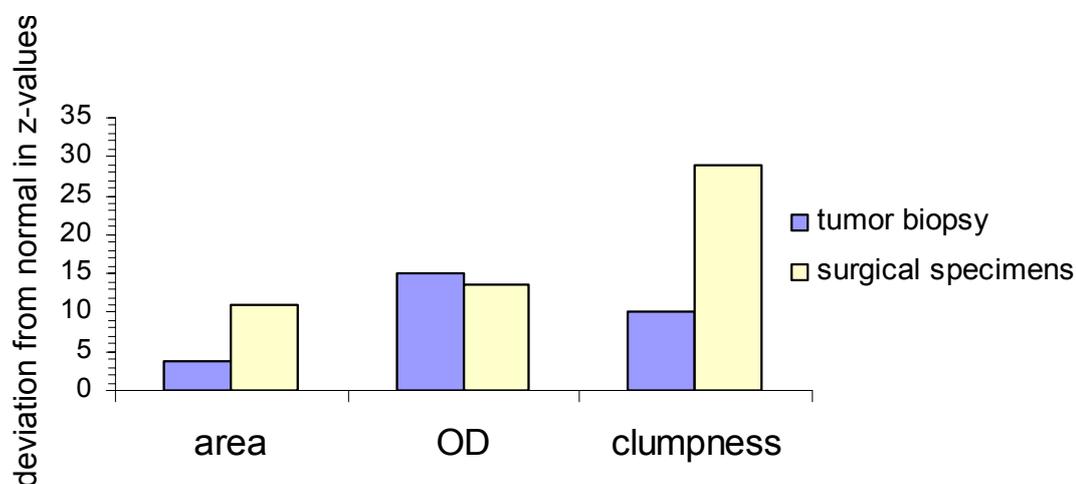


**Figure 1. Nuclear signatures of the controls, tumor biopsy and surgical biopsy groups.**



**Figure 2. Nuclear signatures of the tumor biopsy and biopsy specimen groups.**

### nuclear characteristics



**Figure 3. Nuclear signatures of the tumor biopsy and surgical specimen groups.**

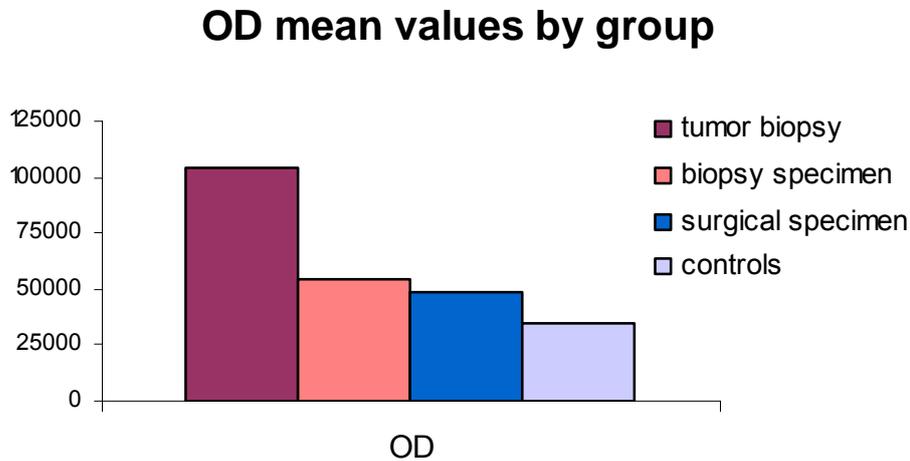
With the z score values of each characteristic of the groups the average nuclear signatures were calculated and compared among the groups (Table 4).

**Table 4. Average nuclear signatures of the groups.**

Groups	Average nuclear signature (sd)	Comparison with the tumor biopsy group (p)
Tumor biopsy	10.095 (7.596)	
Controls	0.864 (0.856)	0.000
Biopsy specimen	22.004 (20.757)	0.003
Surgical specimen	16.115 (15.290)	0.672

Wilcoxon Signed Ranks Test

Finally, the variation of OD characteristic was compared among the groups and the greatest values were observed in the tumor biopsy group as shown in Figure 4.



**Figure 4. OD mean values by group.**

## Discussion

The progress in diagnostic methods, surgical techniques and neoadjuvant chemoradiation therapy (CRT) have greatly improved in the past decades the rate of tumor resection and sphincter-saving procedures for rectal cancer<sup>17-19</sup>. Nevertheless, the causes of recurrence and cancer-related deaths after a presumed curative treatment have not yet been completely explained<sup>20-22</sup>.

These finds explain the need for searching other prognostic factors, beyond TNM or Dukes-Turnbull staging, to improve these results yet. When the nuclear characteristics were compared by groups, the tumor biopsy group was found to be statistically different from the control group (Table 2); same occurring with the average nuclear signature that did not show any difference. On the other

hand this nuclear signature was statistically difference from the control group (Table 4). This confirms the hypothesis that these biopsies of rectal cancer were clearly different from normal rectal tissues by those characteristics and could resemble the original lesions (surgical specimens) of adenocarcinoma from which they have been taken (Figure 1).

To test the hypothesis that the nuclear characteristics and the digital signatures of the tumor biopsies are similar for those variables to the biopsy specimen counterparts, the three analyzed characteristics were compared and have not shown any statistically significant difference for both OD and clumpness characteristics, whereas for the area this difference was significant. This is probably due to the difference of tissue availability of a piecemeal tissue on the biopsy reducing choices of nuclei capture for examination. From the calculation of the “z scores” of both groups, histograms of digital signatures were plotted as shown in Figure 2. When the average nuclear signatures of the tumor biopsy and biopsy specimen groups (10.09 and 22.00) were compared a statistically significant difference was observed (Figure 4). Exploring the cause of this difference one can confirm that during the calculation of the “z scores” of the characteristics OD and clumpness of the biopsy specimen group negative values have been excluded and this has certainly unbalanced the sample since half of cases were reduced in this group.

In contrary, when the strength of the difference by the ES (Table 3) was determined, all comparisons for the three main nuclear characteristics have not statistically differed among them and the values were always near to or below 0.2, thus indicating a least ES and demonstrating that statistical differences of the means of the area would not affect outcomes.

Those results allow us to assume that despite differences on the area, the three nuclear characteristics and the digital signature of the tumor biopsies resemble, for these characteristics, the tumors were those biopsies were taken and the results observed by the ES further corroborates this hypothesis.

Since tumor biopsies revealed to represent their tumor specimen counterparts a comparison between the tumor biopsies and the whole surgical specimens from database was performed showing that the averages of the nuclear characteristics of area and OD have statistically differed while no difference was noted for clumpness. The average of the area was greater in the surgical specimens from database, while the average of the OD was greater in the tumor biopsies (Figure 4) and perhaps the restricted number of nuclei available on the tumor biopsy samples can explain these differences.

Despite that, the difference observed in the values of the OD can also be explained because the distribution of the Dukes-Turnbull B tumors in the tumor biopsies significantly differed between from the surgical specimens (50% and 23.5%) thus resulting in a biased comparison. When these characteristics have been analyzed by the ES the results have been similar to those shown in the comparison of the averages, 2.38 for area and 1.03 for OD. These figures are greater than 0.8 confirming the difference between the groups, but for clumpness, the comparison failed to show any difference (ES = 0.025;  $p = 0.95$ ).

After plotting the z score histograms of the nuclear characteristics for the digital signature only clumpness seemed visually to differ (Figure 3). However, when both average nuclear signatures were calculated no statistically significant difference was observed further corroborating the hypothesis that the digital

signatures of tumor biopsies do resemble the digital signatures of surgical specimens from database as well.

Therefore, it is concluded that digital signature and average nuclear signature of biopsies, histologically characterized as rectal adenocarcinoma, do resemble the tumor specimens from where biopsies were obtained and are close related to the surgical specimens from database bank, which may allow digital signature from tumor biopsies to be preoperatively used for planning treatment approach on rectal cancer. Moreover, where minor differences have been observed should certainly be due to the small number of cases in each group and these differences must be further assessed in a study with a bigger sample.

## References

- 1 Tjandra JJ, Kilkenny JW, Buie WD, Hyman N, Simmang C, Anthony T et al. The Standards Practice Task Force; The American Society of Colon and Rectal Surgeons. Practice parameters for the management of rectal cancer (revised). *Dis Colon Rectum*. 2005;48(3):411-23.
- 2 Finlay I. Preoperative staging for rectal cancer *BMJ* 2006;333;766-767.
- 3 Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759–767.
- 4 Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*. 2007;56(1):140-8.
- 5 Michor F, Iwasa Y, Lengauer C, Nowak MA. Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol*. 2005 Dec;15(6):484-93.
- 6 Jass JR. Colorectal cancer: a multipathway disease. *Crit Rev Oncog*. 2006 Dec;12(3-4):273-87.
- 7 Rosito MA, Moreira LF, da Silva VD, Damin DC, Prolla JC. Nuclear chromatin texture in rectal cancer. Relationship to tumor stage. *Anal Quant Cytol Histol*. 2003; 25(1): 25-30.
- 8 Rosito MA, Damin DC, Moreira LF, da Silva VD, Prolla JC. Nuclear chromatin texture in rectal carcinoma. Prognostic value. *Anal Quant Cytol Histol*. 2003; 25(4): 215-20.
- 9 Bartels P, Da Silva V, D, Montironi R, Hamilton PW, Thompsom D, Vaught L, Bartels HG. Chromatin texture signatures in nuclei from prostate lesions. *Analyt Quant Cytol Histol* 1998;20:407-16.

- 10 Rosito MA. Caracterização de núcleos celulares no adenocarcinoma primário de reto por análise de imagem digital. Tese de Doutorado. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, 2002
- 11 Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg* 1967; 166: 420–27.
- 12 Wied GL, Bartels PH, Bahr GF, Oldfield DG. Taxonomic intra-cellular analytic system (TICAS) for cell identification. *Acta Cytol* 1968;12: 180-204.
- 13 Zar HJ: *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall, 1996.
- 14 Cohen, J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). New Jersey: Lawrence Erlbaum:1988.
- 15 McGraw, K. O., & Wong, S. P. A common language effect-size statistic. *Psychological Bulletin* 1992; 111: 361-5.
- 16 Will G Hopkins A New View of Statistics : Effect magnitudes [homepage na internet] atualização 2002. [acesso em 2008 jan 10] disponível em: <http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html>
- 17 Lim SB. Choi HS. Jeong SY. Kim DY. Jung KH. Hong YS et al. Optimal surgery time after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancers. *Ann Surg*. 2008; 248(2):243-51.
- 18 Habr-Gama A. Perez RO. Proscurshim I. Nunes Dos Santos RM. Kiss D. Gama-Rodrigues J et al. Interval between surgery and neoadjuvant chemoradiation therapy for distal rectal cancer: does delayed surgery have an impact on outcome? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008; 15;71(4):1181-8.
- 19 Ceelen W. Boterberg T. Pattyn P. van Eijkeren M. Gillardin JM. Demetter P et al. Neoadjuvant chemoradiation versus hyperfractionated accelerated radiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(2):424-31.
- 20 Perez RO. Habr-Gama A. Proscurshim I. Campos FG. Kiss D. Gama-Rodrigues J et al. Local excision for ypT2 rectal cancer: much ado about something. *J Gastrointest Surg*. 2007;11(11):1431-8; discussion 1438-40.
- 21 Habr-Gama A. Perez RO. Proscurshim I. Campos FG. Nadalin W. Kiss D. Gama Rodrigues J. Patterns of failure and survival for nonoperative treatment of stage c0 distal rectal cancer following neoadjuvant chemoradiation therapy. *J Gastrointest Surg*. 2006;10(10):1319-28 discussion 1328-9.
- 22 Habr-Gama A. Perez RO. Nadalin W. Nahas SC. Ribeiro U Jr. Silva E Sousa AH Jr et AL. Long-term results of preoperative chemoradiation for distal rectal cancer correlation between final stage and survival. *J Gastrointest Surg*. 2005;9(1):90-9; discussion 99-101.