

MÁRIO ANTONELLO ROSITO

**CARACTERIZAÇÃO DE NÚCLEOS CELULARES NO ADENOCARCINOMA
PRIMÁRIO DE RETO POR ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL**

**TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA – CIRURGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, PARA
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR**

ORIENTADORES

PROF. DR. LUIS FERNANDO MOREIRA

PROF. DR. VINICIUS DUVAL DA SILVA

PORTO ALEGRE

Outubro 2002

R821c Rosito, Mário Antonello

Caracterização de núcleos celulares no adenocarcinoma primário de reto por análise de imagem digital / Mário Antonello Rosito ; orient. Luis Fernando Moreira, Vinicius Duval da Silva. – 2002.

141 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós–Graduação em Medicina: Cirurgia, Porto Alegre, 2002.

1. Neoplasias retais 2. Adenocarcinoma 3. Citometria por imagem 4. Diagnóstico por imagem 5. Cromatina 6. Prognóstico I. Moreira, Luis Fernando II. Silva, Vinicius Duval da III. Título.

NLM: WI 529

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).

Tese defendida e aprovada em 02 de outubro de 2002.

Conceito: A, com Distinção e voto unânime de Louvor da banca examinadora.

“A Medicina exige sempre de seus praticantes uma consciência de sábio e um coração de estudante”.

Jose Paulo Drummond

“Aquele homem que se diz velho demais para aprender, provavelmente sempre foi velho demais para aprender”.

Henry S. Haskins

Dedico este trabalho:

**Aos meus pais José e Gina (in memoriam), por
tudo o que me transmitiram.**

**Para meus filhos Maurício e Fernando e
minha esposa Laura,
agradeço a compreensão, apoio e companheirismo
em todos os momentos.**

**Aos Professores Dr. Pedro Gus e Dr. João F.
Xavier Müssnich que há quase trinta anos me
orientaram os primeiros passos dentro da
Coloproctologia.**

AGRADECIMENTOS

Em especial, aos orientadores **Profs. Drs. Luis Fernando Moreira e Vinícius Duval da Silva** pela transmissão de suas experiências e conhecimentos, estímulo e orientação dedicada à realização deste trabalho, sempre me direcionando o “norte” neste estudo.

Aos Serviços do HCPA, onde se realizaram etapas da Pesquisa: Ao Dr. Daniel de Carvalho Damin, em nome de todos os colegas do Serviço de Coloproctologia, agradeço as sugestões; Prof. Antônio Carlos Kruel Pütten – Patologia, agradeço pela revisões das lâminas; Profa. Themis Reverbel da Silveira – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. João Carlos Prolla, Chefe da Unidade de Citologia do HCPA, local onde foi realizado o trabalho, pela sua colaboração e impulso inicial. Agradeço especialmente a oportunidade de me confiar uma idéia.

Ao Laboratório de Medicina Digital, pela qualidade e pelo auxílio prestado na realização de uma importante etapa deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Rohde, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina – Cirurgia da UFRGS, oportunizando-me o Doutorado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Faculdade de Medicina onde aprendi e compartilhei a maioria das informações obtidas para as conclusões da Graduação em Medicina, Cursos de Mestrado e Doutorado e vida profissional de Médico e Professor.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, local onde realizei a especialização em Cirurgia e Coloproctologia e desenvolvi atividades assistenciais ao longo desses vários anos, das quais geraram os pacientes atendidos que participaram desta pesquisa.

Aos pacientes que, anonimamente, participaram deste trabalho, aos quais nos dedicamos para amenizar as conseqüências de suas doenças e que nos proporcionam estudos para alcançarmos progressos em seus tratamentos.

Ao Dr. Marcos Weindorfer em nome dos médicos Residentes do Serviço de Coloproctologia do HCPA e alunos da FAMED que, pela convivência diária, nos servem de estímulo na busca do conhecimento e aprimoramento nos estudos para o exercício atualizado de nossa profissão.

Ao FIPE/HCPA pelo apoio de material necessário à execução do Projeto de Pesquisa.

À PROPESQ-UFRGS, pelo apoio dispensado para a realização desta pesquisa, em especial à atenção gentil da Profa. Marininha A. Rocha.

Ao Prof. Dr. Mário B. Wagner pela orientação na análise estatística dos dados.

À Microscopia Eletrônica da ULBRA, Laboratório de Microscopia Eletrônica sob a orientação do Prof. Dr. José Rafael Rosito Coiro, consultor técnico-científico, agradecimento por sua disposição em orientar e colaborar numa fase desta pesquisa.

À acadêmica da FAMED-UFRGS Caroline Rech, aluna de iniciação científica, pela prestimosa colaboração e auxílio na reunião dos casos.

Aos Drs. Heloisa Guedes Müssnich e Paulo de Carvalho Contu pela colaboração na busca dos dados e casos da linha de Pesquisa do Prof. Dr. Luis Fernando Moreira do PPG-Cirurgia-UFRGS.

Às secretárias Estela Maris Araripe do PPG-Cirurgia-UFRGS; Nilza e Rose da Unidade de Citologia do HCPA; Eliane e Adelmo do Serviço de Patologia do HCPA, em nome de todos os funcionários que tiveram participação colaborativa para a conclusão deste estudo.

Aos funcionários da Biblioteca da FAMED-UFRGS e BIREME no auxílio na busca do material bibliográfico.

Ao meu filho Maurício pelo auxílio na confecção do trabalho e orientação em Informática.

Ao meu filho Fernando pela colaboração e assistência que prestou de forma global.

Aos meus irmãos José Rosito Filho e Aldo A. Rosito, em nome dos familiares.

A todas as pessoas e instituições que contribuíram direta ou indiretamente para que esta Tese fosse concluída.

À Don Pêpe, personagem de “Bianca di Morano”, agradeço ao autor José Carlos Laitano sua criação, pois foi onde, com as lembranças antepassadas, inspirou-me o desejo de progredir com esta Tese.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ANEXOS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	01
2.0 OBJETIVOS	03
3.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	04
3.1 Adenocarcinoma de reto; considerações	04
3.2 Adenocarcinoma de reto; fatores prognósticos	10
3.3 Matriz nuclear nas neoplasias malignas	17
3.4 Assinatura digital e análise de imagem digital	22
4.0 METODOLOGIA	31
4.1 Delineamento do estudo	31
4.2 População estudada	31
4.2.1 Critérios de elegibilidade	32
4.2.2 Amostra estudada	34

4.2.3 Variáveis estudadas	34
4.2.4 Avaliação clínico-patológica	35
4.3 Preparação do material	37
4.3.1 Análise de imagem digital; extração da assinatura digital	38
4.3.1.1 Sistema de captura de imagem (videofotômetro)	38
4.3.1.2 Procedimentos de extração das características nucleares	41
4.3.1.3 Definição de conjuntos de núcleos estudados	44
4.3.1.4 Assinaturas nucleares; histogramas	45
4.4 Análise estatística	50
4.5 Ética	53
5.0 RESULTADOS	54
6.0 DISCUSSÃO	83
7.0 CONCLUSÕES	99
8.0 PERSPECTIVAS	100
9.0 ANEXOS	102
10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP: Amputação abdominoperineal de reto

A / D: analógico/digital

AP: anátomo patológico

CCD: charge coupled device, (componente principal das videocâmaras)

CCR: câncer colorretal

CEA: antígeno carcinoembriônico

cm: centímetros

Dmpn: distância média padronizada da população normal

DNA: ácido desoxirribonucléico

dp: desvio padrão

DOT ou IOD: densidade óptica total

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FAMED: Faculdade de Medicina de Porto Alegre

FAP: Polipose adenomatosa familiar

FIPE: Fundo de Incentivo à Pesquisa

FRO: frequência relativa de ocorrência

GPPG: Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: hematoxilina e eosina

HNPCC: Câncer colorretal humano não polipóide

INCA: Instituto Nacional do Câncer

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

ng/ml: nanogramas por mililitro

nm: nanomois

PPG: Programa de Pós-Graduação

RNA: ácido ribonucléico

SAMIS/HCPA: Serviço de Arquivo Médico e Informação em Saúde do HCPA

SIM: Sistema de Informação sobre Mortalidade

SV: Sobrevida

TEP: Tamanho do efeito padronizado

TICAS: Taxonomic Intra-Cellular Analytic System

TNM: Classificação Tumor, Nódulo, Metástase

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Conjunto e subconjunto de núcleos estudados	44
Tabela 02. Exemplo de tabela parcial com valores das características nucleares dos núcleos segmentados de um caso	46
Tabela 03. Características genéricas dos grupos	54
Tabela 04. Características dos adenocarcinomas de reto	55
Tabela 05. Procedimentos cirúrgicos realizados	57
Tabela 06. Comparação das médias das características cariométricas entre o grupo câncer e o grupo normal	63
Tabela 07. Comparação das médias das características cariométricas entre o grupo normal e o estadiamento	64
Tabela 08. Comparação das médias das características cariométricas entre o grupo normal, subgrupos vivos sem doença e óbitos em 5 anos de seguimento	66
Tabela 09. Comparação das assinaturas médias nucleares entre o grupo normal e câncer	71
Tabela 10. Comparação das assinaturas médias nucleares entre o grupo normal e o estadiamento	72
Tabela 11. Comparação das assinaturas médias nucleares entre o grupo normal, vivos sem doença e óbitos	73
Tabela 12. Modelo de Cox. Risco de óbito segundo variáveis de interesse	80
Tabela 13. Modelo de Cox com as variáveis da assinatura digital	82
Tabela 14. Identificação dos casos e núcleos dos grupos câncer e normal, anexo 02	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Eletromicrografia do núcleo de reto normal humano	19
Figura 02. Eletromicrografia do núcleo de adenocarcinoma de reto humano	20
Figura 03. Campo microscópico da imagem digital de adenocarcinoma de reto	40
Figura 04. Campo microscópico da imagem digital de reto normal	41
Figura 05. Arquivo de núcleos segmentados de adenocarcinoma de reto	42
Figura 06. Arquivo de núcleos segmentados de reto normal	43
Figura 07. Curva de sobrevida global em meses	59
Figura 08. Curva de sobrevida por estágios de Dukes-Turnbull	60
Figura 09. Curva de sobrevida nas cirurgias curativas e não curativas	61
Figura 10. Assinatura nuclear do grupo câncer	68
Figura 11. Assinaturas nucleares do normal e dos estágios de Dukes-Turnbull	69
Figura 12. Assinatura nuclear do subgrupo vivos sem doença	70
Figura 13. Assinatura nuclear do subgrupo óbitos	70
Figura 14. Assinatura de padrão histológico do grupo câncer	74
Figura 15. Assinaturas de padrão histológico do normal e dos estágios de Dukes-Turnbull	75
Figura 16. Assinatura de padrão histológico do subgrupo vivos sem doença	76
Figura 17. Assinatura de padrão histológico do subgrupo óbitos	76
Figura 18. Histograma da distribuição da Densidade Óptica Total no grupo câncer	77
Figura 19. Histograma da distribuição da Densidade Óptica Total no grupo normal e nos estágios de Dukes-Turnbul I	78

LISTA DE ANEXOS

Anexo 01. Material da Microscopia Eletrônica	102
Anexo 02. Origem dos núcleos dos casos estudados	103
Anexo 03. Características nucleares do Sistema TICAS	105
Anexo 04. Aprovação da Comissão de Ética do GPPG-HCPA	118
Anexo 05. Respostas dos recebimentos dos artigos enviados para publicações	119

RESUMO

O câncer colorretal é um tumor maligno freqüente no mundo ocidental. É o terceiro em freqüência e o segundo em mortalidade nos países desenvolvidos. No Brasil está entre as seis neoplasias malignas mais encontradas e a quinta em mortalidade.

Dos tumores colorretais, aproximadamente 40% estão localizados no reto.

A sobrevida, em cinco anos, dos pacientes operados por câncer do reto varia entre 40% e 50%, estando os principais fatores prognósticos, utilizados na prática clínica corrente, baseados em critérios de avaliação clínico-patológicos.

A avaliação das alterações morfométricas e densimétricas nas neoplasias malignas tem, recentemente, sido estudadas e avaliadas através da análise de imagem digital e demonstrado possibilidades de utilização diagnóstica e prognóstica.

A assinatura digital é um histograma representativo de conjuntos de características de textura da cromatina do núcleo celular obtida através da imagem computadorizada.

O objetivo deste estudo foi a caracterização dos núcleos celulares neoplásicos no adenocarcinoma primário de reto pelo método da assinatura digital e verificar o valor prognóstico das alterações nucleares da textura da cromatina nuclear para esta doença.

Foram avaliados, pelo método de análise de imagem digital, 51 casos de pacientes operados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) entre 1988 e 1996 e submetidos à ressecção eletiva do adenocarcinoma primário de reto, com seguimento de cinco anos pós-operatório, ou até o óbito antes deste período determinado pela doença, e 22 casos de biópsias normais de reto obtidas de pacientes submetidos a procedimentos endoscópicos, para controle do método da assinatura digital.

A partir dos blocos de parafina dos espécimes estocados no Serviço de Patologia do HCPA, foram realizadas lâminas coradas com hematoxilina e eosina das quais foram selecionados 3.635 núcleos dos adenocarcinomas de reto e 2.366 núcleos dos controles da assinatura digital, totalizando 6.001 núcleos estudados por análise de imagem digital.

De cada um destes núcleos foram verificadas 93 características, sendo identificadas 11 características cariométricas com maior poder de discriminação entre as células normais e neoplásicas. Desta forma, através da verificação da textura da cromatina nuclear, foram obtidos os histogramas representativos de cada núcleo ou conjunto de núcleos dos grupos ou subgrupos estudados, também no estadiamento modificado de Dukes, dando origem às assinaturas digitais correspondentes.

Foram verificadas as assinaturas nucleares, assinaturas de padrão histológico ou de lesões e a distribuição da Densidade Óptica Total. Houve diferença significativa das características entre o grupo normal e o grupo com câncer, com maior significância para três delas, a Área, a Densidade Óptica Total e a Granularidade nuclear. Os valores das assinaturas médias nucleares foram: no grupo normal 0,0009 e nos estadiamentos; 0,9681 no A, 4,6185 no B, 2,3957 no C e 2,1025 no D e diferiram com significância estatística ($P=0,001$). A maior diferença do normal ocorreu no subgrupo B de Dukes-Turnbull. As assinaturas nucleares e de padrão histológico mostraram-se distintas no grupo normal e adenocarcinoma, assim como a distribuição da Densidade Óptica Total a qual mostra um afastamento progressivo da normalidade no grupo com câncer. Foi possível a caracterização do adenocarcinoma de reto, que apresentou assinaturas digitais específicas. Em relação ao prognóstico, a Densidade Óptica Total representou a variável que obteve o melhor desempenho, além do estadiamento, como preditor do desfecho.

ABSTRACT

Colorectal cancer is a frequent malignancy in the western world, being the third cancer in frequency and the second in mortality in developed countries. In Brazil, it is among the six more frequently found neoplasias, being the fifth tumor as cause of death.

Of all colorectal tumors, approximately 40% are located in the rectum. The 5-year survival rate for patients with rectal cancer is 40% to 50%. Currently, the main prognostic factors in clinical practice are based on clinicopathologic criteria.

Recently, the study of pathologic changes in malignant nuclei, through analysis of digital images, was introduced showing potential use as a diagnostic tool and a prognostic predictor. It is visualized as a “digital signature”, which is displayed as a histogram descriptive of the nuclear chromatin texture obtained through computerized image. The aim of this study was to characterize the nuclear signature in a large series of rectal carcinomas, assessing the prognostic value of nuclear chromatin texture patterns in these type of tumors.

Samples were obtained from 51 patients operated on for rectal adenocarcinoma and from endoscopic biopsies of 22 health subjects at the University Training Hospital (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil, between 1988 and 1996.

The sample consisted of 2.366 nuclei from normal controls and 3.635 nuclei from rectal cancer specimens paraffin-embedded, obtained at the Pathology Unit, HCPA. Therefore, a total of 6.001 HE-stained nuclei were included in the study.

Ninety-three nuclear features were investigated to each nucleus. Eleven karyometric

features were identified as distinctive for rectal tissue. Three of them presented statistically significant differences: nuclear area, total optical density (OD) and clumpness. Likewise, comparison between average nuclear signature values also presented statistical significance, with a higher difference between patients classified as Dukes' stage B and normal controls. Average values were 0,0009; 0,9681; 4,6185; 2,3957; 2,1025 for controls and Dukes A through D, respectively ($p=0,001$).

Digital signatures and OD showed distinct patterns between cancer and controls, with a progressive deviation from normal values. It was possible to characterize the rectal adenocarcinoma, which showed specific digital signatures. Along with cancer staging, OD was the karyometric feature with the highest prognostic value.

1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O carcinoma colorretal (CCR) é mais freqüente no mundo ocidental. Sua incidência é variável, entre 3,4 e 35,8 casos por 100.000 habitantes. O número de casos novos tem aumentado no mundo, de 500.000 para 783.000 nos anos de 1975 e 1990, respectivamente. No mundo, de um modo geral, e particularmente nos Estados Unidos e Europa ocidental é o terceiro tumor maligno em freqüência, sendo o segundo em mortalidade em países desenvolvidos e oitavo em países em desenvolvimento.

O câncer de reto contribui com aproximadamente 40% dos CCR. Apesar destes tumores poderem ser diagnosticados facilmente pelo toque retal e retossigmoidoscopia, são descobertos, invariavelmente, em estágios avançados, com índices de ressecabilidade entre 70% e 92%. As cirurgias com intenção curativa são possíveis em 75% dos casos, porém 50% dos casos já têm comprometimento metastático linfonodal regional no momento da cirurgia.

O tratamento do câncer de reto é essencialmente cirúrgico. Com a intenção de diminuir as recorrências locais, que se situam entre 3% e 32%, e distantes, que ocorrem entre 50% e 65% dos casos, o tratamento complementar rádio-quimioterápico pode ser realizado, no período pré ou pós-operatório nos casos com finalidade curativa.

É fundamental o conhecimento dos fatores que podem auxiliar a prognosticar a evolução do câncer de reto. Atualmente, estes fatores são alicerçados em parâmetros clínico-patológicos estáticos, como a extensão da penetração do tumor na parede retal, o comprometimento metastático linfonodal regional, e a presença de metástases em órgãos distantes. Outros indicadores de prognóstico de características histopatológicas, avaliação

de dano genético e de regulação do ciclo celular, não fazem parte da prática clínica rotineira.

Há, portanto, necessidade de se pesquisar novos parâmetros prognósticos que possam ser obtidos na fase pré-operatória, e que auxiliem na tomada de decisão do tratamento cirúrgico mais adequado e na seleção de quais os pacientes que realmente poderiam se beneficiar com tratamentos complementares, com o intuito de se alcançar índices melhores de sobrevida e menores de recidiva locoregional ou distantes.

O câncer de reto, como as demais neoplasias malignas, caracteriza-se por determinar alterações na estrutura celular, sendo que as modificações nucleares em volume, forma, organização interna, como a disposição da cromatina e características nucleares, são importantes para o seu diagnóstico cito e histopatológico.

O estudo e a avaliação morfométrica e densimétrica do núcleo celular neoplásico, por assinatura digital, tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de muitos tumores, como: próstata, mama, esôfago e endométrio.

Com relação ao adenocarcinoma de reto, não existe na literatura, até o momento, nenhum estudo de suas características morfométricas e densimétricas através de imagem digital, bem como a verificação do seu desempenho como fator prognóstico. Com base nos dados acima apresentados, este trabalho procura caracterizar os núcleos celulares no adenocarcinoma de reto, através de um método que envolve uma complexidade de caracteres nucleares e da textura da cromatina, e representá-los por um histograma representativo (assinatura digital), com metodologia contemporânea de parâmetros subvisuais e verificar o seu potencial diagnóstico e prognóstico nesta neoplasia.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a textura da cromatina nuclear e verificar a assinatura digital no adenocarcinoma primário de reto por análise de imagem digital.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Verificar o valor prognóstico das alterações nucleares da textura da cromatina nos adenocarcinomas de reto.

3.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ADENOCARCINOMA DE RETO; CONSIDERAÇÕES

O câncer colorretal (CCR) é um dos tumores malignos mais freqüentes, sendo o terceiro tumor maligno mais comum no mundo, em ambos os sexos. É a segunda causa de mortalidade em países desenvolvidos ocidentais e oitavo em países em desenvolvimento.

Na Europa Ocidental e nos Estados Unidos da América é o terceiro tumor maligno em freqüência¹. São diagnosticados 134.600 novos casos por ano e ocasiona 55.300 mortes por ano, neste último país². A incidência mundial varia entre 3,4 e 35,8 casos por 100.000 habitantes, sendo uma das três principais causas de mortalidade por neoplasia maligna³. O número de novos casos de CCR no mundo tem aumentado, em 1975 era de aproximadamente 500.000 novos casos, passando para uma estimativa de 783.000 novos casos diagnosticados mundialmente em 1990⁴.

No Brasil, em 1997, o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), do Ministério da Saúde registrou 6.552 óbitos por Neoplasia Maligna de Intestino Grosso, tendo 791 casos ocorridos no Rio Grande do Sul. A estimativa do Ministério da Saúde através do Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de que a neoplasia maligna do cólon e reto atinja uma incidência, baseados nos dados do SIM e nos Registros de Câncer de Base Populacional, de 16.165 casos novos de CCR. Correspondendo, então, a 18,96 casos por 100.000 habitantes, sendo 7.795 em homens e 8.370 em mulheres, ficando em sexto lugar em freqüência geral e ocasionando uma estimativa de óbitos de 7.230 pessoas, 3.355 indivíduos do sexo masculino e 3.875 do feminino, sendo a quinta e sexta causa de morte por câncer, respectivamente.

Para o Rio Grande do Sul a estimativa do INCA de casos novos de câncer de cólon e reto foi de 1.630, 31,97/100.000 habitantes em 2001, determinando 880 óbitos, 17,14/100.000 habitantes^{5,6}. Neste estado o CCR é a quarta causa de morte por neoplasia e a segunda causa de morte por tumor gastrointestinal, sendo o responsável por 50% dos casos de câncer na população acima dos 65 anos⁷.

Cerca de 39% dos tumores malignos colorretais situam-se no reto⁸. O adenocarcinoma, gerado a partir do epitélio glandular, é o tumor maligno mais freqüente do intestino grosso, corresponde a 95% dos carcinomas colorretais, sendo 10% do tipo mucoprodutor⁹. Predomina em idosos, em ambos os sexos proporcionalmente, e com pico de incidência na sétima década. Em relação aos tumores de intestino grosso, a proporção dos adenocarcinomas de reto tem sido decrescente nas últimas duas décadas, com aumento de casos no cólon proximal. A mortalidade pela doença teve um leve declínio a partir de 1985, mormente em mulheres¹⁰.

O câncer do cólon e do reto é apresentado na literatura, no conjunto abrangente denominado câncer colorretal, numa referência conjunta no que concerne à epidemiologia, etiologia, fatores de risco e patologia. As diferenças entre os tumores de cólon e reto se dão em relação às características da região anatômica entre o cólon e reto, o que proporciona variações quanto às modalidades de tratamentos. Apesar de alguns autores acharem que possam ter fatores etiológicos distintos¹¹, o câncer do cólon e do reto permanecem unidos, sendo separados para facilitar a abordagem terapêutica¹².

Alguns autores tentam estabelecer uma divisão do CCR em tumores proximais e distais em relação à flexura esplênica do cólon, alegando diferenças embriológicas, etiológicas, e de mecanismos patogênicos, padrões moleculares e características biológicas^{13,14}, porém ainda sem integração com a prática clínica.

A sobrevida global dos pacientes com CCR situa-se entre 40% e 60% em 5 anos. Apesar do aprimoramento dos métodos diagnósticos, da técnica e tratamento cirúrgico e do tratamento complementar rádio-quimioterápico adjuvante, os índices de sobrevida em 5 anos tiveram aumentos discretos nas últimas quatro décadas. Estes índices eram de 32% para o câncer de cólon e de 29% para o câncer de reto na década de 1940 a 1949 nos Estados Unidos da América¹⁵. Porém, se a doença se restringe à invasão das camadas da parede intestinal, pode obter-se com tratamento adequado, uma sobrevida de 76% a 90% num período de 5 anos. Em contraste, a sobrevida é de somente 7%, no mesmo período, naqueles pacientes que já apresentam metástases distantes no momento do diagnóstico do CCR. A sobrevida alcançada, em 1996, em 5 anos, situou-se em 43% para o câncer de reto e 50% para o câncer de cólon¹⁰.

A etiologia do CCR é desconhecida, embora fatores ambientais e genéticos estejam implicados¹⁶. A carcinogênese colorretal é um processo complexo, consistindo de uma série de influências de ordem mutagênica interligadas e influenciadas por fatores ambientais. Tanto as mutações gênicas podem ocorrer na seqüência adenoma-carcinoma, levando lesões precursoras ao carcinoma invasivo¹⁷, quanto pode decorrer do carcinoma “de novo“, de mucosa aparentemente normal para carcinoma¹⁸, sem componente adenomatoso vizinho, não se ajustando ao modelo de ex-adenoma da carcinogênese do CCR¹⁹⁻²¹.

As alterações gênicas podem, na maioria das vezes, ocorrer de forma esporádica. Porém, existem alterações de transmissão hereditária cada vez mais estudadas e compreendidas²²⁻²⁴.

O processo da carcinogênese do CCR destacou-se dentre os estudos dos tumores malignos pelos avanços de conhecimentos dos fatores envolvidos, principalmente com a publicação do modelo genético proposto por Fearon e Vogelstein²⁵ na seqüência adenoma-

carcinoma, a qual é responsável pela maioria dos casos de CCR esporádico e da polipose adenomatosa familiar¹⁵. O acúmulo de mutações ou de alterações genéticas no processo da carcinogênese colorretal tem um papel importante, muito provavelmente maior que a seqüência isolada dos eventos envolvidos^{21,25}.

O estudo do prognóstico do câncer colorretal é de fundamental importância para se esperar resultados mais eficientes em relação a sua abordagem terapêutica. Porém, até o momento, o prognóstico do carcinoma do cólon e do reto continua sendo avaliado por aspectos histopatológicos. Embora se use a classificação clínico-patológica com o estadiamento TNM²⁶, a classificação mais amplamente utilizada, ainda hoje, é a de Dukes²⁷, principalmente com as modificações propostas por Turnbull²⁸, ou com outras adaptações^{29,30}.

O estadiamento clínico pré-operatório tem limitações devido ao grau de dependência dos métodos diagnósticos disponíveis. O estadiamento histopatológico completo só é possível após a exploração e ressecção cirúrgica adequada. O planejamento de um tratamento pré-operatório neoadjuvante, ou mesmo de um procedimento cirúrgico mais racional, fica prejudicado pela falta de elementos de certeza para a tomada de decisões mais apropriadas para cada caso específico.

Há que se ter em conta, para a decisão de tratamento adjuvante, as características próprias do tumor dependentes de sua biologia molecular, que podem influir de maneira dinâmica na evolução da doença, frustrando os índices de sobrevida esperados em determinados casos, baseados somente em parâmetros estáticos clínico-patológicos.

O tratamento do câncer de reto é cirúrgico, baseando-se na remoção em bloco do tumor, incluindo linfonodos regionais e estruturas adjacentes envolvidas⁸. Houve progresso na compreensão da disseminação do câncer de reto. Técnicas oncológicamente seguras

permitiram a conservação esfínteriana em muitos casos, respeitando-se com segurança os limites de margens livres de doença e ampliando-se a ressecção de tecidos perirretais laterais e mesorreto³¹. O tratamento radioterápico e quimioterápico complementar ao tratamento cirúrgico do câncer de reto, na fase pré ou pós-operatória tem alcançado diminuição da recidiva locorregional e distante³²⁻³⁴. A seleção dos pacientes para o tipo de técnica cirúrgica a ser utilizada e a seleção de pacientes para o tratamento complementar é de fundamental importância³⁵. Houve progresso também dos métodos de localização e detecção do câncer de reto com o desenvolvimento da endoscopia e exames sofisticados de imagens.

Considerando-se os índices de ressecabilidade do CCR entre 70% e 92% e que cerca de 75% das cirurgias são realizadas com intenção curativa³⁶, o impacto de toda esta tecnologia pouco se refletiu no objetivo de aumentar a sobrevida global nos pacientes portadores de câncer de reto, que permanece atualmente nos índices de 50% em 5 anos¹².

No momento do diagnóstico cerca de 25% dos pacientes têm metástases à distância e 50% já têm comprometimento linfonodal regional. Da mesma forma, 50% a 65% vão desenvolver metástases metacrônicas e 3% a 32% vão desenvolver recidiva locorregional^{10,12,36}.

A cirurgia é considerada curativa quando é possível a remoção de toda a extensão macroscópica do tumor e não há evidências de doença microscópica comprometendo as margens da ressecção e nem evidência de doença neoplásica detectável em estruturas ou órgãos distantes^{37,38}.

Portanto, há necessidade de se buscar parâmetros prognósticos mais precisos, preferencialmente na fase pré-operatória. O estudo das alterações genéticas e o mecanismo de controle do ciclo celular, índices de proliferação celular anormal ou expressão de

determinados oncogenes ou genes supressores de tumores em vários tipos de neoplasias humanas, inclusive o carcinoma colorretal, tem sido realizado. Porém o papel exato das informações destes eventos moleculares oncogênicos e as alterações genéticas e sua utilização clínica como fator de prognóstico do câncer de reto, ainda está por ser totalmente definido^{39,40}.

Estudos de núcleos celulares, quantificação e morfometria do DNA empregando tecnologia avançada como a citomorfometria acoplada a sistema computadorizado para seleção, processamento, visualização e caracterização de alterações nucleares têm-se mostrado de utilidade na verificação de categorias diagnósticas e possibilidades prognósticas de alguns tumores humanos com a utilização da análise da imagem digital⁴¹⁻⁴⁶.

As técnicas de caracterizações de estruturas nucleares não quantificáveis ou visualisáveis à microscopia óptica convencional e os mais recentes estudos de núcleos neoplásicos verificando a textura da cromatina por método da análise cito-morfométrica digital se mostraram de valor no diagnóstico e prognóstico nas neoplasias malignas. Como foi verificado, na próstata, por Da Silva e colaboradores⁴⁷ e Bartels e colaboradores⁴⁸ ao estudarem os parâmetros de distribuição da cromatina nuclear e forneceram novas informações do núcleo celular neoplásico.

3.2 ADENOCARCINOMA DE RETO; FATORES PROGNÓSTICOS

Fator prognóstico é uma característica ou marcador que pode ajudar a predizer ou mapear o curso ou o término de uma doença ou processo patológico⁴⁹.

Os fatores de prognóstico do câncer de reto são dependentes de múltiplas variáveis que refletem o estado clínico da doença nos pacientes acometidos pelo tumor. Prognosticar significa esperar um provável curso evolutivo ou termo de uma doença baseado no

diagnóstico e nas possibilidades terapêuticas. Possibilita, portanto, instituir uma escolha terapêutica mais adequada para tentar a obtenção de melhores resultados. Atualmente, o prognóstico para o adenocarcinoma de reto está alicerçado em parâmetros clínicos e patológicos. A avaliação microscópica de cortes histológicos e dos esfregaços celulares é baseada na experiência diagnóstica do patologista e provê diagnósticos adequados na maioria das situações. Porém tem suas limitações, e é passível diferenças de interpretações^{50,51}.

A identificação e a valorização correta destes fatores de influência no prognóstico é de fundamental importância na expectativa de sobrevivência dos pacientes. Muitos desses fatores utilizados há várias décadas, permanecem em uso clínico, como o estadiamento patológico do tumor de reto proposto por Dukes, sendo ainda considerado o principal, mais simples e consistente^{52,53}. Procuramos novas modalidades para auxiliar avaliação prognóstica, com estudos de caracteres que possam traduzir melhor a expectativa esperada do curso ou término da doença, além dos métodos disponíveis até o momento, abrangendo a biologia molecular e o comportamento biológico dos tumores, genética ou genes e das alterações nucleares da célula neoplásica.

Fatores clínicos

Dentre os fatores clínicos a idade, sexo, presença de sintomas não se mostraram relevantes quanto ao prognóstico do câncer de reto na maioria dos trabalhos da extensa revisão realizada por Ratto e colaboradores⁵², reunindo estudos que utilizavam análise estatística univariada e multivariada, apesar deste autor em seu próprio estudo ter encontrado melhor prognóstico entre as mulheres estudadas, como também Rawet⁵⁴, nos

quais a idade não afetou o prognóstico. A presença de sintomas seria mais relacionada à expressão clínica do estadiamento do tumor, refletindo uma maior disseminação⁵².

Fatores próprios do tumor

Dentre os fatores de prognóstico dependentes das características do próprio tumor, seriam relacionados: os macroscópicos, como; tamanho, localização, aspecto ou forma do tumor, obstrução e perfuração. Os histopatológicos ou microscópicos, como; extensão da penetração na parede do reto, invasão da gordura perirretal, comprometimento linfonodal, vinculados ao estadiamento patológico de Dukes²⁷, grau de diferenciação histológica, invasão venosa, invasão perineural, invasão de órgãos adjacentes e metástases distantes.

Os fatores histopatológicos da peça operatória, relacionados ao estadiamento baseados na classificação de Dukes²⁷, são os fatores prognósticos de maior importância⁵² e tem-se repetidamente provado sua correlação com a sobrevida dos pacientes⁵³. São os principais critérios utilizados para a indicação de tratamentos complementares adjuvantes ou neoadjuvantes. A extensão da penetração do tumor na parede retal e nas estruturas adjacentes tem forte valor prognóstico⁹. A presença de doença metastática também implica em um curso prognóstico desfavorável, com diminuição da sobrevida⁵². O comprometimento linfonodal exerce influência desfavorável no prognóstico, sendo mais negativa a presença de quatro ou mais linfonodos positivos ou de localização lateral ou inguinal⁵⁵. A extensão da invasão perirretal, do mesorreto, deve ser levada em conta como fator prognóstico e tem importância no momento do tratamento⁵⁶, sendo sua ressecção importante na diminuição da recidiva locorregional após tratamento cirúrgico curativo do tumor de reto baixo^{37,56}.

Tumores operados no estágio A de Dukes²⁷, confinados à parede retal e sem metástases linfáticas, usualmente têm um bom prognóstico, com sobrevida em 5 anos de 90% a 100%,

enquanto no estágio B, com tumores estendendo-se além da parede retal e sem metástases linfáticas, a sobrevida esperada em 5 anos é de 75% a 85%. No estágio C, em que apresentam metástases linfáticas, a sobrevida média esperada em 5 anos fica entre 30% e 40%. Pacientes com metástases distantes, no estágio D de Dukes-Turnbull²⁸, têm sobrevida média esperada em 5 anos de somente 5%. A sobrevida média esperada em 5 anos é de 51%⁵⁷.

Está bem estabelecida a relação prognóstica da invasão tumoral na parede retal, estruturas adjacentes, linfonodos e metástases distantes com a expectativa de sobrevida dos pacientes tratados cirurgicamente, conforme estabelecido por Dukes²⁷ e modificado por Turnbull²⁸. As outras modificações a estes modelos de estadiamento do câncer de reto, acrescentadas por Astler e Collier²⁹, Gunderson e Sosin³⁰ estratificam mais detalhadamente estes mesmos parâmetros valorizados por Dukes²⁷. O sistema TNM²⁶ diferencia-se por incluir a importância do número de linfonodos envolvidos. Com o envolvimento de mais de três linfonodos, reduz-se a sobrevida em 5 anos para 18% e de um a três linfonodos envolvidos a sobrevida em 5 anos é de 45% a 50%⁵⁴.

Em nosso meio, Rosito e colaboradores^{58,59} revisaram casos de 145 pacientes com tumores de reto com altura média de 5,45 cm. da margem anal submetidos a amputação abdominoperineal no HCPA entre 1973 e 1992. A sobrevida global foi de 49,55% em 5 anos, e distribuída nos estágios de Dukes, modificado por Turnbull²⁸ foi de A = 79%; B = 53,70%, C = 37,66% e D = 0%. O índice de recidiva locorregional foi de 22,5%, salientando-se que no período do estudo o tratamento quimio-radioterápico era pouco disponível.

A invasão venosa extramural parece ter valor desfavorável no prognóstico, diferentemente da invasão venosa submucosa que não o altera^{37,54,60}. A perfuração do tumor

pode comprometer o prognóstico proporcionando maior recorrência da doença^{10,52,60-62}. Outros fatores citados anteriormente, relacionados ao tumor como; tamanho, localização, aspecto macroscópico, diferenciação histológica, obstrução, invasão neural, invasão de órgãos adjacentes tem resultados conflitantes e parecem não exercer influência direta no prognóstico como fatores independentes, estando mais relacionados com o próprio estadiamento patológico da doença^{9,10,52}. A invasão neural como fator prognóstico do CCR não parece ter influência, em revisão de vários trabalhos realizados por Ratto e colaboradores⁵², como também foi a conclusão de Cruz⁶³. Em contrapartida, Rawett⁵⁴ verificou ter valor de influência negativa no prognóstico, como também concluiu Moreira e colaboradores⁶⁴ relacionando-a com a recorrência local. A produção de muco pelo adenocarcinoma de reto não demonstrou impacto significativo no prognóstico, como verificado por Rawet⁵⁴. A angiogênese parece ter um papel inicial importante no desenvolvimento da formação de metástases de tumores e Tarta⁶⁵ demonstrou associação com a profundidade de invasão tumoral. Outros fatores que são citados na literatura, implicados na redução da sobrevida incluem: menor infiltrado inflamatório peri-neoplásico e maior necrose peri-tumoral.

A diferenciação histológica do tumor não contribuiu com informação adicional ao prognóstico no estudo de Rawet⁵⁴, que concluiu serem as variáveis independentes com maior influência na sobrevida de 5 anos o sexo, infiltrado inflamatório, linfonodos e metástases.

Em outro estudo, realizado em nosso meio, Müssnich⁶⁶ concluiu como fatores prognósticos independentes para o câncer de reto médio e distal somente a classificação de Dukes modificada²⁹, a diferenciação tumoral, o grau de penetração na parede e o comprometimento linfonodal. O grau de diferenciação histológica do tumor é valorizado no

câncer retal como um fator de menor ou maior risco de recidiva e de decisão para a indicação de ressecções locais⁶⁷⁻⁶⁹. Kraemer e colaboradores⁶⁹ em análise multivariada concluíram que só o estadiamento de Dukes e a invasão aos recidos adjacentes se mostraram fatores prognósticos independentes adversos para a recorrência do CCR e o grau histológico e a fixação do tumor seriam fatores prognósticos adicionais adversos no câncer de reto.

Fatores cirúrgicos

Alguns parâmetros do tratamento cirúrgico dos tumores de reto são importantes para se alcançar resultados mais favoráveis em pacientes que se submetem a cirurgias consideradas curativas. A técnica cirúrgica é importante e deve ser abrangente e localmente adequada. Devem ser respeitados limites oncológicamente seguros referentes às margens proximal, distal e lateral^{37,70-73}; excisão do mesorreto^{37,74}; excisão da área de drenagem linfovascular correspondente ao tumor com ligadura dos pedículos vasculares principais em seus locais de emergência⁷⁵ e excisão em bloco de estruturas ou órgãos adjacentes se estiverem invadidos pelo tumor³⁶. Estes são fatores que podem variar de acordo com a experiência e especialização do cirurgião, como também as técnicas cirúrgicas empregadas em instituições onde são orientadas as cirurgias em hospitais ligados ao ensino e à residência médica. Podem, também, afetar as expectativas de cura contribuindo para um aumento da recidiva locoregional e ter influência na sobrevida em 5 anos⁷⁶⁻⁷⁸.

Respeitadas as diretrizes oncológicas de ressecção do câncer de reto, uma adequada técnica cirúrgica localmente abrangente, baseada na compreensão da disseminação do câncer retal, possibilita a escolha da melhor opção a ser executada, tanto cirurgias

conservadoras de esfíncter ou amputação abdominoperineal do reto, ou quanto ao tipo de sutura em anastomose manual ou grampeada, sem afetar os resultados de sobrevida ou recidiva locorregional³⁶.

Fatores laboratoriais e outros

Outras maneiras de se tentar prognosticar o câncer de reto, com intenção de melhor selecionar os pacientes que poderiam se beneficiar com tratamentos complementares adjuvantes radio-quimioterápicos para obtenção de resultados mais favoráveis, foram testadas. A dosagem sérica pré-operatória do antígeno carcinoembriônico (CEA) foi avaliada para esta finalidade. Altos valores de referência do CEA podem estar relacionados com possibilidades de recorrência da doença⁷⁹ ou com doença oculta não detectada^{80,81}. No entanto, os valores pré-operatórios parecem estar mais diretamente relacionados em refletir o estadiamento clínico-patológico de extensão da doença, sendo seu valor prognóstico pré-operatório independente contestado⁸². Esta relação do CEA pré-operatório e o estágio de disseminação do CCR foram encontrados por Gus e colaboradores⁸³ num estudo realizado no HCPA, tendo seus níveis proporcionalmente elevados de acordo com os estágios de Dukes-Turnbull²⁸.

A citometria de fluxo para avaliação da ploidia e distribuição do DNA tem mostrado pouca utilidade na prática clínica⁹. Tem valor prognóstico incerto⁵³, apesar da tendência do conteúdo maior de DNA diplóide ser mais favorável que o aneuplóide. No entanto, seu significado como valor de prognóstico independente no câncer colorretal é variável, não trazendo vantagens sobre o estadiamento proposto por Dukes⁵³ e considerada de pouco

valor prognóstico⁸⁴. No estudo de Araújo e colaboradores⁸⁵ não ficou demonstrada uma correlação entre a ploidia do DNA do CCR, avaliada através da citometria digital, e o prognóstico do CCR e a atividade proliferativa tumoral e não houve associação com as variáveis clínico-patológicas estudadas.

Novos fatores vêm sendo estudados para avaliação de seu poder prognóstico no CCR, com resultados, no momento, ainda incertos, mostrando mais tendências do que certezas e oferecendo perspectivas futuras promissoras. Incluem-se: a medição da atividade proliferativa e índices de apoptose de células tumorais; detecção de antígenos de membrana celular e ativadores e inibidores do plasminogênio. Também, há interesse na busca de fatores interligados às anormalidades moleculares genéticas, como; detecção de oncogenes e genes supressores de tumores e genes reguladores da instabilidade genômica⁵².

As alterações genéticas têm sido reconhecidas em muitos tumores malignos e tem modelo proposto para o CCR²⁵, com algumas mutações identificadas⁸⁶. Algumas alterações numéricas de cromossomos determinam mudanças no conteúdo do DNA celular e podem ser reconhecidas com o auxílio da citometria de imagem. A citometria convencional de fluxo, não se mostrou de valor em prognosticar metástases colorretais⁸⁷. A citometria de imagem do DNA tem mostrado associação com a agressividade biológica das metástases hepáticas colorretais e de utilidade como fator de prognóstico após sua ressecção⁸⁸. O estudo do grau de ploidia e outros parâmetros citométricos de imagem do DNA mostrou utilidade no prognóstico do CCR^{42,89}.

A morfometria nuclear associou a alteração da forma e tamanho dos núcleos de tumores colorretais com a sobrevida dos pacientes⁹⁰ e com pior prognóstico, como fator independente do sexo, idade, grau histológico e classificação de Dukes⁹¹.

Os eventos nucleares da transformação neoplásica são de importância ímpar na modificação das estruturas celulares que ocorrem no adenocarcinoma de reto e as pesquisas atuais se concentram em tentar desvendá-los.

3.3 A MATRIZ NUCLEAR NAS NEOPLASIAS MALIGNAS

O modelo do núcleo celular baseado na microscopia óptica seria de três elementos: a cromatina, que corresponderia apenas à heterocromatina; o nucléolo e o nucleoplasma ou cariolinfa⁹², envolvidos pela membrana nuclear.

Com o advento da microscopia eletrônica a partir dos anos 50, estruturas submicroscópicas foram reveladas nas regiões entre a cromatina densa. Fawcett sugeriu o termo matriz nuclear em 1966 para a cariolinfa⁹³. A matriz nuclear é a subestrutura que permanece após a utilização de diferentes técnicas de preparação para microscopia eletrônica e que se tornou visível com o desenvolvimento de colorações regressivas baseadas em EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid ou ácido etilendiaminotetracético) e é composta por grânulos protéicos e filamentos conectados à lâmina própria do núcleo^{94,95}. A forma nuclear é governada por um sistema dinâmico que conecta as redes tridimensionais da matriz extracelular, citoesqueleto e matriz nuclear⁹².

O modelo atual do núcleo celular típico mostra o núcleo envolvido por um envelope nuclear constituído por duas membranas e poros nucleares. 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 ribonucleoproteínas e a matriz nuclear in situ, formando uma rede difusa que conecta o nucléolo e a cromatina aos poros nucleares⁹².

As Figuras 01 e 02 ilustram o núcleo do reto normal e do adenocarcinoma de reto, respectivamente, visualizados pela Microscopia Eletrônica (vide anexo 01), ilustrando alguns aspectos das distribuições de cromatina nuclear.

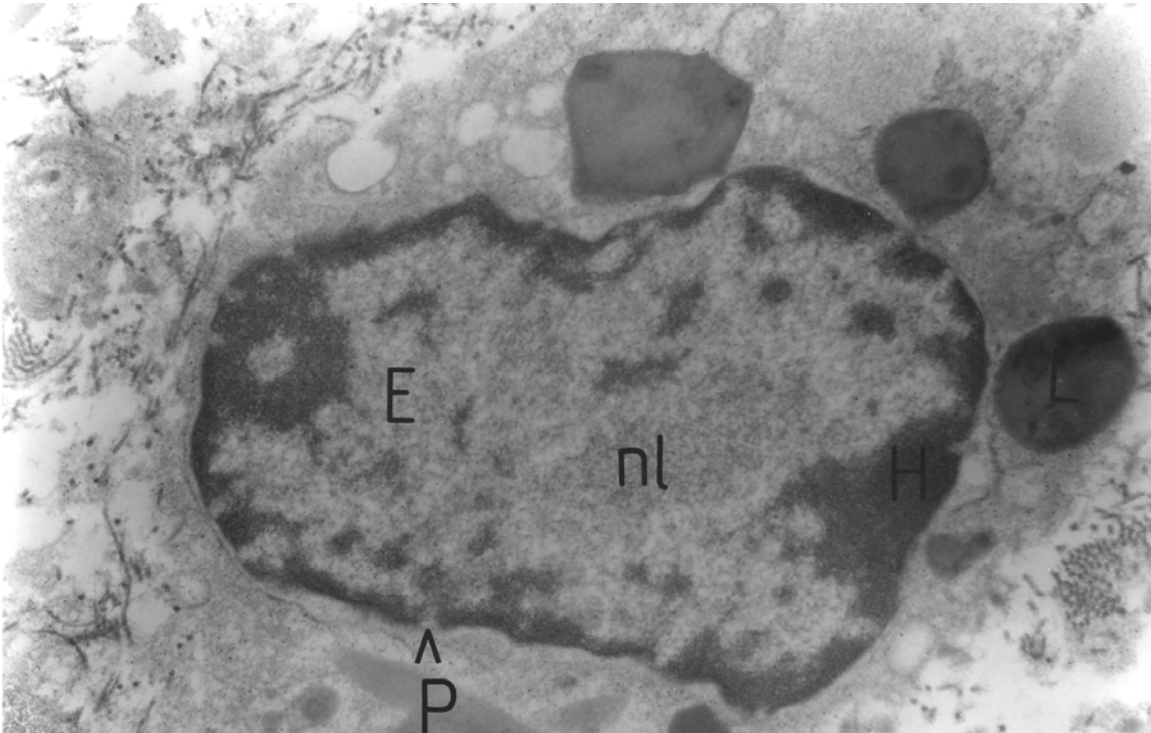


FIGURA 01. Eletromicrografia de núcleo de reto normal humano

Aumento: aproximadamente 18.400 X.

E = Eucromatina

P = Poro nuclear

H = Heterocromatina

L = Lisossomo

nl = nucléolo

Como pode ser observada nas Figuras 01 e 02, a distribuição da cromatina densa e difusa são distintas no núcleo de reto normal e no adenocarcinoma de reto.

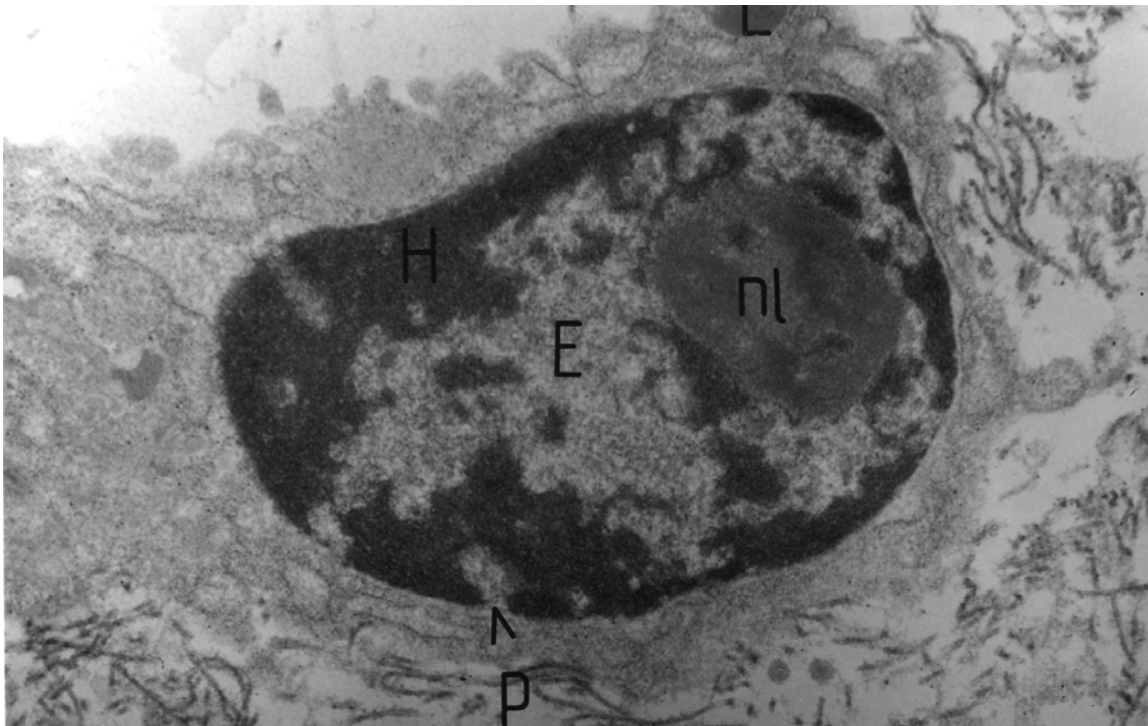


FIGURA 02. Eletromicrografia de núcleo de adenocarcinoma de reto humano

Aumento: aproximadamente 21.420 X.

E = Eucromatina

P = Poro nuclear

H = Heterocromatina

L = Lisossomo

nl = Nucléolo

A cromatina densa (heterocromatina) se distribui pelo interior do núcleo celular típico, até a periferia e envolve o nucléolo. Entre as áreas de cromatina densa existem as chamadas

regiões intercromatínicas, que contém a cromatina difusa (eucromatina) e a matriz nuclear, o que sugere uma associação potencial entre a replicação e transcrição da cromatina e os componentes da matriz nuclear⁹⁶. Os domínios estruturais estão na matriz nuclear in situ; os domínios de cromatina correspondem aos pontos de ancoragem das duplas hélices de DNA^{97,98}. Os domínios de ribonucleoproteínas são relacionados ao processamento e transporte de ácido ribonucléico (RNA). A matriz nuclear atua como um sistema de coordenação de transcrição, processamento e transporte rumo aos poros nucleares⁹⁹. A composição protéica da matriz nuclear depende do estado de diferenciação celular e varia entre diferentes tipos celulares; é o único elemento nuclear com composição química diretamente relacionada ao fenótipo da célula^{100,101}.

A matriz nuclear nas neoplasias malignas é alterada por modificações progressivas do tamanho, forma e organização nucleares que acompanham a malignidade^{102,103}. Tais modificações estruturais são de significado diagnóstico fundamental, embora não compreendidas na profundidade. Estudos bioquímicos recentes têm demonstrado que determinados tumores humanos apresentam proteínas da matriz nuclear ausentes no tecido normal correspondente. Isso já foi demonstrado em neoplasias da próstata^{104,105}, mama¹⁰⁶, cólon¹⁰⁷, colo uterino¹⁰⁸.

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 genoma⁹². Porém, encontrando justificativa teórica na organização nuclear a nível ultra-estrutural e mais próximo dos procedimentos rotineiros dos laboratórios de patologia cirúrgica e citopatologia estão os métodos de quantificação por análise de

imagens baseados em microscopia óptica convencional e aplicados a espécimes preparada e coradas por técnicas básicas, como as utilizadas neste trabalho.

3.4 ASSINATURA DIGITAL E ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL

A integração da patologia com a tecnologia digital e a teoria da informação¹⁰⁹ também descortina novos horizontes utilizando técnicas de videomicroscopia digital e processamento de dados aplicados a dados clínicos e imagens microscópicas. A análise de imagem digital permite mensurar características celulares e teciduais, como a forma e tamanho do núcleo, distribuição da cromatina e centenas de outras características. A quantificação em patologia acrescenta objetividade na avaliação de casos e utiliza métodos capazes de aumentar a capacidade diagnóstica, prognóstica e possivelmente terapêutica¹¹⁰.

A **assinatura digital** é um conjunto de características densimétricas baseadas na distribuição da cromatina nuclear¹¹¹, descritos em padrões de características numéricas definidas, das quais algumas são mais representativas¹¹², e suas primeiras publicações surgiram em 1998^{48,113,114}. Em nosso meio, Da Silva sob a orientação de Prolla¹¹⁵, realizaram o primeiro trabalho com assinaturas nucleares, utilizando material histopatológico de prostatectomias, verificando alterações das assinaturas digitais em núcleos morfológicamente normais, próximos a lesões precursoras ou áreas de carcinomas^{47,115}. Posteriormente, Meurer em 2000, caracterizou as assinaturas nucleares digitais em biópsias de esôfago, estabelecendo diferenças entre os núcleos normais, displásicos e neoplásicos, com avaliação de 15 características cariométricas¹¹⁶. Bersch em estudo recente¹¹⁷ caracterizou uma assinatura digital específica para os núcleos de tecido pancreático normal e para os da neoplasia pancreática e definiu sete características

nucleares como marcadores do adenocarcinoma de pâncreas, pela técnica da cariometria digital.

Também recentemente, Scarpelli e colaboradores¹¹⁸ utilizaram a análise da textura da cromatina nuclear para identificar diferenças em neoplasias corticais adrenais e tecido normal adjacente.

Da Silva e colaboradores¹¹⁹, em 2001, utilizaram características cariométricas e, através da assinatura nuclear de lesões no esôfago de Barrett, comparando-as na displasia, carcinoma e tecido normal, concluíram que as alterações mensuradas mostraram lesões mais desenvolvidas do que previamente se supunha na análise da metaplasia do esôfago de Barrett. Trabalho semelhante foi realizado em relação à assinatura digital no endométrio¹²⁰. No cólon Fernández-Lopez e colaboradores estudaram a relação do prognóstico em pacientes operados de CCR e relacionaram o prognóstico com fatores cariométricos e estadiamento de Dukes, concluindo que a forma e tamanho dos núcleos podem auxiliar no prognóstico⁹⁰.

A análise de imagens permite detectar alterações subvisuais, como alterações sutis no padrão de cromatina nuclear, como verificado em lesões colônicas¹²¹.

A morfometria estuda áreas, superfícies, formas e tem sido aplicada a cortes histológicos para graduação e avaliação prognóstica de neoplasias⁴⁴. Hoje as avaliações tridimensionais de preparados citológicos derivam quase exclusivamente da estereologia e a planimetria é utilizada em avaliações de áreas e objetos com duas dimensões¹¹⁵.

A estereologia utilizada para estudos de microscopia é adequada em cortes de alguns micrômetros que permite visualização de detalhes morfológicos através da microscopia óptica convencional, baseada na trans-iluminação do tecido estudado, e definição da extensão do plano de foco (profundidade focal). A estereologia torna possível estimar

volumes a partir de frações da área e áreas de superfície a partir do comprimento de linhas de forma eficiente, acurada e rápida^{122,123}.

Microfotometria

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. 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 a Lei de Beer, onde:

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

Sendo:

A = valor de absorbância; determina o quanto da luz será absorvida pelo espécime.

I_t = intensidade da luz transmitida.

I_o = 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, originando a chamada Lei de Lambert – Beer, expressa como:

$$A = \epsilon.C.L$$

Sendo:

A = valor de absorbância.

ϵ = Constante que expressa o coeficiente de densidade óptica por mili-mol do corante utilizado.

C = concentração do corante expressa em mili-mois por centímetro cúbico.

L = espessura do corte expressa em centímetros¹²⁴.

Baseado nessas equações, a densidade óptica foi definida e relacionada à concentração e espessura do material absorvente por Bunsen e Roscoe¹²⁵. As primeiras utilizações documentadas da microfotometria relacionadas à cromatina nuclear foram por A. Köhler que comentou a forte absorção de luz na faixa de onda ultravioleta pela cromatina nuclear¹²⁶. Em 1933, Mainland¹²⁷ demonstrou que o conteúdo da cromatina em núcleos de células normais é constante. Posteriormente, foram descobertas diferenças microfotométricas relacionadas à compactação da cromatina¹²⁸. A conversão de sinais analógicos para digitais tornou possível a representação de imagens ópticas como matrizes de valores de densidade óptica e o começo da videomicroscopia e da análise de imagens digitais.

Os valores de densidade óptica refletem, em sua distribuição espacial, uma estrutura de dependências, que encontra suporte no estudo ultraestrutural da cromatina e matriz nuclear^{129,130}. Núcleos apresentam grânulos densos de cromatina e 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. Núcleos em estados funcionais diversos são caracterizados por estruturas de dependência de densidade óptica diferentes.

A análise de imagem digital consiste no uso de computadores para derivar informação numérica relacionada a características da imagem selecionada, tais como perímetros, áreas, densidade óptica e outras¹³¹. O processo de análise de imagem digital consiste em vários estágios: Aquisição (ou captura) e transcrição da imagem para o formato digital;

processamento (ou condicionamento) da imagem; segmentação; extração de características morfométricas e fotométricas; análise de características e classificação.

Aquisição e transcrição

A aquisição e transcrição da imagem para o formato digital 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 que converte informações muitas vezes contínuas no espaço em unidades elementares, como o elemento de imagem ou pixel. Quanto maior o número de pixels de uma imagem melhor é o detalhe ou resolução¹³².

A análise de imagem digital é baseada na aceitação da hipótese de que a representação bidimensional de um objeto pode ser interpretada pela análise do arranjo de unidades numéricas definidas ou picture elements (pixels) que a compõe. Deste modo, as imagens digitais podem ser submetidas a operações lógicas ou descritas por funções¹³³.

Processamento de imagem

Uma imagem digital pode necessitar de processamento que pode corrigir ou minimizar problemas relacionados à iluminação e óptica do microscópio e que permite extração de informação com ou sem redução de dados.

Segmentação

A segmentação determina os elementos ou conjuntos de elementos que serão analisados.

A segmentação de uma imagem pode ser feita: a) pelo observador, b) interativa, o computador faz a seleção preliminar e a final é feita pelo observador ou c) automática, realizada inteiramente pelo computador 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. Pode ser feita por dois métodos; os sistemas especialistas e as redes neurais.

A posição e a informação óptica de cada pixel na imagem são armazenadas na memória do computador como números que podem ser integrados para cada núcleo ou para todos os núcleos de uma imagem¹³².

Extração de características morfométricas e microfotométricas

A partir da imagem obtida após a segmentação, o programa de um computador faz a extração dos dados. Essa etapa é realizada nas regiões selecionadas pela segmentação, onde programas de computador podem extrair informações sobre as várias características geométricas, tais como áreas, perímetros e relacionadas à textura da cromatina. Usualmente extraem características morfométricas.

Análise de características e classificação

Os programas de análise de imagem geram planilhas numéricas compatíveis com programas como Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA), por exemplo. Programas estatísticos mais completos como o SPSS (SPSS, Chicago, IL, EUA) e Statmost (Datamost, Salt Lake City, UT, EUA) e Image Pro Plus, versão 4.1 Silver Springs USA, geralmente

são necessários aos programas de análise de imagem. Os procedimentos de classificação são normalmente baseados em testes estatísticos não paramétricos¹³⁴.

A representação de imagem 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 de um 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. Além de estatística descritiva, as imagens digitais oferecem informações que podem ser consideravelmente específicas na caracterização de um núcleo celular¹¹⁵.

A análise de imagem digital tornou-se um foco de pesquisa de extração de informação diagnóstica que incluem também estruturas de dependência, identificação, informação diagnóstica e prognóstica, como uma 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 desenvolvidos¹³⁵.

Interpretação de imagem

É de grande importância uma correta identificação de objetos em estudo nas etapas da análise de imagem. A identificação de imagem em patologia consiste no reconhecimento das estruturas histológicas de interesse. Esta tarefa pode ser realizada por um observador treinado, mas é exaustiva 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 suficientes¹¹⁵. Já a segmentação de imagens a partir de cortes histológicos apresenta dificuldades e a maior parte das pesquisas tem 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. A segmentação de imagem pode ser guiada por sistemas especialistas¹³⁶.

Sistemas especialistas são programas de computador desenhados para substituir ou reproduzir os métodos de raciocínio de um especialista humano¹³⁷.

Em 1968, o projeto TICAS (taxonomic intra-cellular analytic system)¹¹², mostrou uma taxa elevada de caracterização correta do material baseado nos padrões de distribuição espacial da cromatina. Estudos adicionais passaram a recomendar o uso de imagens digitais para estudos objetivos da cromatina¹³⁸, e demonstraram diferenças pronunciadas entre células de tipos histológicos 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 considera a frequência relativa da co-ocorrência de valores de densidade óptica de diferentes faixas, que podem ser considerados diferentes símbolos ou letras e permitem avaliar esquemas de dependência em diferentes direções de uma imagem digital. A análise de imagem permite identificar a ocorrência e distribuição de determinadas características presentes no núcleo celular¹¹⁵.

Em relação aos estudos dos fatores prognósticos com a análise de imagem digital, têm sido realizados trabalhos utilizando dados morfométricos nucleares associados a outros parâmetros tradicionais. Na próstata, por exemplo, a associação da avaliação densimétrica (ploidia) como fator prognóstico com o uso de outros descritores matemáticos para o

núcleo mostrou ser fator preditivo isolado, bem como associado aos já previamente descritos estágio clínico, escore de Gleason e idade. Tal associação foi capaz de estratificar os pacientes em três grupos, predizendo o tempo de progressão na curva de Kaplan-Meier¹³⁹. Este novo conjunto de características densimétricas passou a ser designado de assinatura nuclear digital. Nos estudos de Bartels e colaboradores^{48,113} e de Da Silva¹¹⁵, foi sugerida a utilização da assinatura nuclear como forma de caracterização de núcleos e populações celulares, posto que cada núcleo tem uma assinatura específica.

4.0 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O trabalho consiste em uma Coorte histórica não concorrente, onde foram estudadas as características de textura da cromatina nuclear em diferentes áreas e núcleos de diferentes espécimes cirúrgicos de adenocarcinoma de reto, por método de análise de imagem digital. O momento da cirurgia foi considerado o tempo zero e o desfecho foi a sobrevida (SV) após 5 anos ou a morte atribuída ao tumor de reto.

4.2 POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram incluídos 160 pacientes com adenocarcinoma primário de reto, submetidos à cirurgia eletiva, com ressecção do tumor, entre janeiro de 1988 e dezembro de 1996, no Serviço de Coloproctologia do HCPA. Foram avaliados os casos conforme os critérios de elegibilidade.

Lâminas para coloração em hematoxilina-eosina (HE)¹⁴⁰ para verificação da assinatura digital foram preparadas a partir dos blocos de parafina das peças cirúrgicas estocados pelo Serviço de Patologia do HCPA. Para o controle do método de extração das características nucleares da assinatura digital, foram utilizados blocos de parafina estocados no Serviço de Patologia do HCPA, de materiais de retos que foram biopsiados em colonoscopias realizadas pela equipe do Serviço de Coloproctologia do HCPA no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2000, por alguma suspeita de alteração clínica, e com resultados anátomo-patológicos sem alterações. Todas as lâminas HE, após, foram revisadas por um

segundo patologista, com experiência em patologia gastrointestinal para confirmação diagnóstica e exclusão de outros processos patológicos.

4.2.1 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão para a população em estudo que poderiam interferir nas avaliações das assinaturas digitais ou sobrevida dos pacientes.

Foram **incluídos** os casos comprovados por exame anátomo-patológico de adenocarcinoma único e primário de reto submetidos à ressecção cirúrgica eletiva. O reto foi considerado, para fins prático-cirúrgico, até 15 centímetros (cm) da margem anal por medição por retossigmoidoscopia rígida, excluindo-se o canal anal, iniciando a 3 cm da margem anal, no anel anorretal¹⁰. Todos os casos foram operados no Serviço de Coloproctologia do HCPA e tiveram seguimento clínico mínimo pós-operatório de 5 anos ou abaixo desse período nos casos de óbito pela doença. Como controle do método da assinatura digital foram utilizados os casos de pacientes com resultados anátomo-patológicos sem alterações, de materiais de retos que foram submetidos a colonoscopias e biopsiados por alguma suspeita clínica, pelo Serviço de Coloproctologia do HCPA, e excluídos neoplasias, doença inflamatória de reto e canal anal ou rádio-quimioterapia prévia.

Foram **excluídos** os seguintes casos:

- . Com período de seguimento pós-operatório inferior a cinco anos (excetuando-se os casos de morte causada pela neoplasia de reto).
- . Outros tipos de neoplasia, afora o adenocarcinoma de reto.
- . Portadores de doença inflamatória intestinal ou polipose intestinal de qualquer tipo.

- . Cirurgias sem ressecção do tumor ou somente ressecção local do tumor de reto.
- . Cirurgia de urgência ou de tumores recidivados ou de tumores metacrônicos ou com tumores sincrônicos de reto.
- . Tumores de canal anal ou com invasão do canal anal.
- . Outras neoplasias concomitantes ou história de tumores colorretais prévios.
- . Terapia de quimiorradiação neo-adjuvante ou rádio e/ou quimioterapia prévia.
- . Óbitos por outras causas, não diretamente relacionados ao adenocarcinoma de reto.
- . Pacientes cujos dados não puderam ser completamente revisados ou não tiveram acompanhamento pós-operatório completo, ou com dados incompletos quanto ao óbito ou evolução clínica mínima de 5 anos pós-cirúrgica.
- . Pacientes operados por adenocarcinoma de reto, cujos blocos de parafina não foram encontrados no Serviço de Patologia do HCPA, indisponíveis para o estudo.
- . Pacientes cujos prontuários não foram encontrados para revisão no Serviço de Arquivo Médico e Informações em Saúde do HCPA (SAMIS/HCPA), ou com dados incompletos de seguimento.

4.2.2 AMOSTRA ESTUDADA

A amostra analisada, de casos que preencheram os critérios de elegibilidade, constituiu-se de 51 casos de adenocarcinoma de reto (grupo câncer), com 3.635 núcleos e 22 casos para controle do método de extração das características da assinatura digital (grupo normal), com 2.366 núcleos.

Dos 160 casos de adenocarcinomas de reto que inicialmente compunham o trabalho, foram excluídos os seguintes: 49 sem seguimento clínico completo por cinco anos; 36 sem

blocos disponíveis no Serviço de Patologia do HCPA; 10 por óbitos clínicos não relacionados ao tumor de reto; dois por realizarem radioterapia pré-operatória; cinco em que o bordo inferior do tumor estava situado acima dos 15 cm da margem anal; três sem cirurgias de ressecção do tumor e quatro tumores de reto submetidos à cirurgia de ressecção local.

4.2.3 VARIÁVEIS ESTUDADAS

Para caracterização da amostra estudada foram apresentadas as seguintes variáveis: idade, sexo, dosagem sérica do antígeno carcinoembriônico (CEA) pré-operatório, grau de diferenciação histológica do tumor e produção de muco, invasão venosa e neural, recidiva tumoral locorregional e distante, seguimento pós-operatório, sobrevida global em 5 anos e tempo de sobrevida livre de doença, motivo do óbito em período inferior a 5 anos, cirurgia curativa ou paliativa, procedimento cirúrgico realizado, estadiamento clínico-patológico do tumor, presença de metástases linfáticas ou distantes e tratamento adjuvante pós-operatório e para a população de 22 controles da assinatura digital (grupo normal), a idade, sexo, e exame anátomo-patológico (AP).

As variáveis foram relacionadas ou comparadas com os histogramas representativos das assinaturas nucleares digitais obtidas e comparadas entre si.

4.2.4 AVALIAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA

A rotina do Serviço de Coloproctologia do HCPA para pacientes com adenocarcinoma de reto, consiste: fase pré-operatória; história e exame físico completo, exame proctológico completo incluindo toque retal, exame ginecológico, exames bioquímicos de laboratório com provas de função hepática e outros exames clínicos necessários para a cirurgia,

dosagem do CEA, radiografia de campos pulmonares, ecografia abdominal total, endoscopia com biópsia do tumor, freqüentemente colonoscopia, e retossigmoidoscopia rígida para aferir a distância do tumor da margem anal. Outros exames são solicitados conforme a necessidade de avaliação do caso e disponibilidade de execução, especificamente; a tomografia computadorizada abdominal e pélvica, ou ainda de tórax, cintilografia óssea, cistoscopia, urografia venosa e cistografia, ecografia endorretal ou ecoendoscopia ou outros específicos. Fase intra-operatória, para complementação do estadiamento, consta da revisão e palpação dos órgãos e estruturas intra-abdominais, de técnica de ressecção do tumor com abrangência da gordura perirretal e área de drenagem linfática correspondente, margens lateral e distal mínima de 2 centímetros, ligadura linfovascular ao nível da emergência da artéria mesentérica inferior⁸, ressecção em bloco de estruturas ou órgãos envolvidos sempre que possível. Fase pós-operatória; estudo anátomo-patológico do espécime cirúrgico ressecado para completar o estadiamento clínico-patológico, revisões clínicas cada 3 a 4 meses nos 2 primeiros anos e após, cada 6 meses até o quinto ano e após anual, com controles do CEA, e outros exames de acordo com a necessidade do caso. Radiografia de campos pulmonares e ecografia abdominal total após um ano e anualmente até o quinto ano, com solicitação de outros exames conforme a necessidade por alterações nestes, como a tomografia abdominal e pélvica, ressonância magnética pélvica, ecografia endorretal, cintilografias ou outros. Colonoscopia após um ano e posteriormente cada 3 anos, ou antes se necessário. Em cirurgias conservadoras de esfíncter, também, retossigmoidoscopia rígida anual até o quinto ano, juntamente com toque retal.

Os procedimentos cirúrgicos foram catalogados conforme o tipo de ressecção realizada: amputação abdominoperineal de reto, retossigmoidectomia abdominal com ou sem

anastomose, anastomose grampeada ou manual (cirurgia conservadoras de esfíncter) e também quanto a probabilidade ou possibilidade de cirurgia curativa³⁷. Os casos de excisão local do tumor per ânus foram eliminados do estudo por não permitirem um exame completo do espécime cirúrgico em relação à avaliação dos linfonodos regionais, e exame intra-operatório do abdome. Os casos de recidiva local ou distante foram identificados pelos exames de acompanhamento, realizados no seguimento pós-operatório, desde o exame físico até a biópsia. Os casos de metástases distantes sincrônicas detectadas foram eliminados da análise da recidiva.

O estadiamento patológico de Dukes²⁷ e modificado por Turnbull²⁸ (Dukes-Turnbull) foi utilizado, visto que este sistema mantém estreita relação com os estágios do sistema UICC/TNM²⁶, sendo o estágio A: tumor restrito a parede retal. B: tumor invade a serosa e/ou gordura peri-retal e C: tumor presente com metástases nos linfonodos regionais. Foi utilizado o estágio D para os casos com metástases à distância. Os casos de tumores irrissecáveis por invasão de estruturas ou órgãos adjacentes foram eliminados do estudo.

O grau de diferenciação histológica do adenocarcinoma de reto utilizado foi bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado¹⁶.

Considerou-se: sobrevida total; período desde o diagnóstico na cirurgia até o tempo máximo de seguimento de 5 anos, mesmo com sinais de recidiva da doença ou até o óbito, determinado pela doença dentro deste período de tempo. Sobrevida livre de doença; período em meses desde o diagnóstico na cirurgia até o momento da descoberta da recidiva da doença ou ao final de 5 anos. Recidiva local e locorregional; foi considerada quando surgiu lesão tumoral recidivante ou não na região anatômica previamente acometida pelo tumor primário de reto, num período inferior a 5 anos. Recidiva distante; foi considerada

quando da constatação ou não de doença metastática com envolvimento de órgãos ou locais não diretamente relacionados ao reto, sugerindo disseminação hemática.

Considerou-se a ausência ou presença de tratamentos complementares de rádio ou quimioterapia realizados somente no período pós-operatório em caráter adjuvante ou paliativo para não haver possibilidade de alteração das células neoplásicas por tratamento de quimioirradiação pré-operatória neoadjuvante, sendo estes casos não elegíveis.

4.3 PREPARAÇÃO DO MATERIAL

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, à partir dos blocos de parafina representativos dos casos dos grupos câncer e normal.

Procedimentos de coloração: foram utilizadas as técnicas para coloração das lâminas com hematoxilina e eosina (HE) de Mayer¹⁴⁰.

As lâminas confeccionadas foram também revisadas por patologista com experiência em tumores gastrointestinal para confirmação dos laudos anátomo-patológicos prévios, com concordância de resultados das categorias diagnósticas (câncer e normal).

A partir das lâminas HE revisadas foram realizadas as etapas da aquisição das assinaturas nucleares digitais, por análise de imagem digital, resultando os histogramas representativos.

4.3.1 ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL; EXTRAÇÃO DA ASSINATURA DIGITAL

4.3.1.1 SISTEMA DE CAPTURA DE IMAGENS (VIDEOFOTÔMETRO)

As lâminas coradas por HE foram visualizadas num sistema de captura de imagens (videofotômetro), na Unidade de Citologia do HCPA, e dotado dos seguintes componentes¹⁴¹.

Componente óptico: utilizou-se um microscópio óptico convencional marca Olympus BX60, dotado de sistema de iluminação Köhler e condensadores Abbé e lentes objetivas plano-acromáticas de 20 e 50 aumentos, com imersão (Olympus Optical Co., Tokyo, Japão). O microscópio conta com um fototubo, óptica plana com amplificação de 1 X e lentes de projeção com 10 aumentos determinando resoluções finais de 200 e 500 aumentos.

Dispositivo CCD: foi acoplada uma videocâmara monocromática 3CCD color Sony, modelo DXC-970 MD (Sony, Park Ridge, NJ, EUA.) ao fototubo do microscópio Olympus para captura de imagens com magnificação de 200 e 500 X. As imagens foram monitoradas através de monitor de vídeo Sony (Sony, Park Ridge, NJ, EUA.) Trinitron PVM 1954 Q com telas de 14 polegadas.

Placas digitalizadoras de imagem: foi utilizada placa de captura (Image Pro Plus 4.1-Media Cybernetics, Silver Springs, EUA) 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.

Microcomputadores: a placa de captura de imagem foi acoplada ao 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, com sistema operacional Microsoft Windows 98 (Microsoft, Redmond, WA, EUA.).

O sistema de digitalização é formado por microscópio óptico com videocâmara, placa digitalizadora de imagem e microcomputador. A imagem digital criada 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 uma placa digitalizadora conectada ao elemento gerador de imagens (CCD ou charge coupled device)¹¹⁵.

As Figuras 03 e 04 mostram as imagens digitais capturadas de um campo microscópico de um caso de adenocarcinoma e de um reto normal, respectivamente.

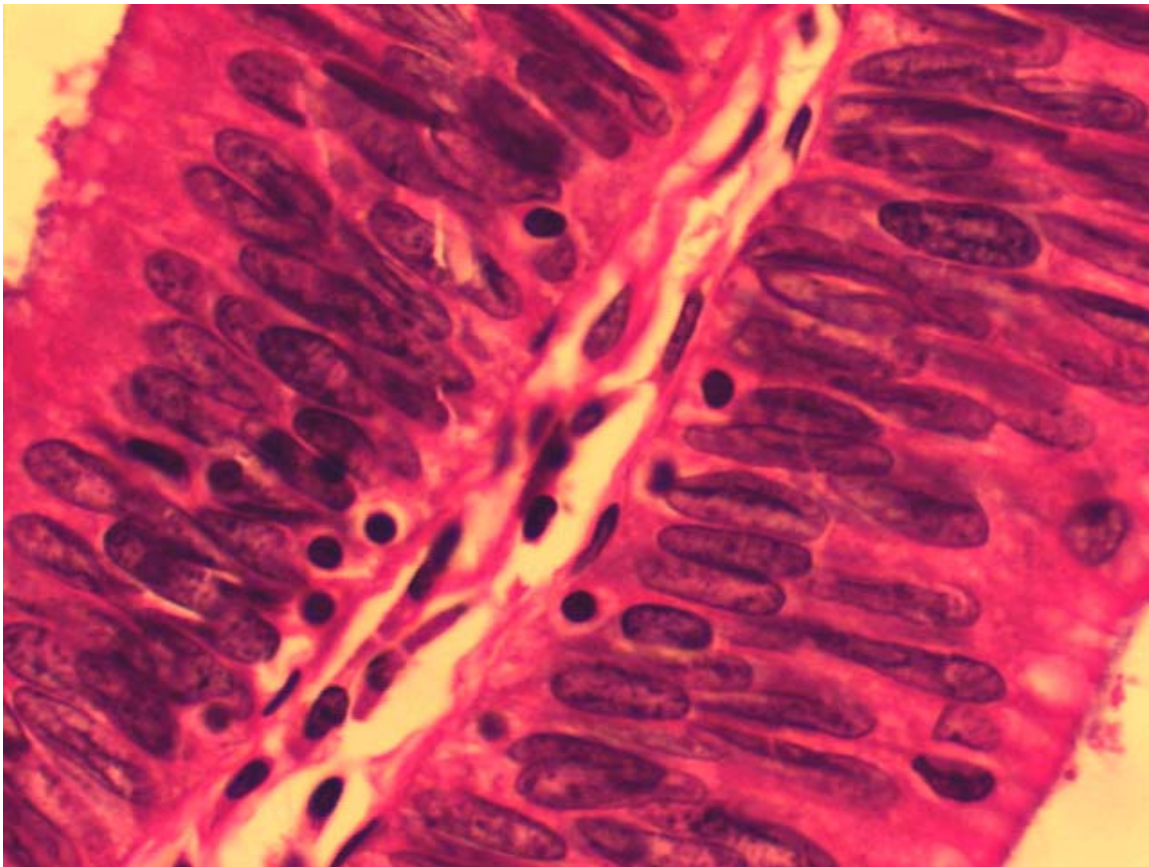


FIGURA 03. Campo microscópico de imagem digital de adenocarcinoma de reto. HE, 500X. Caso nº/AP – 101004

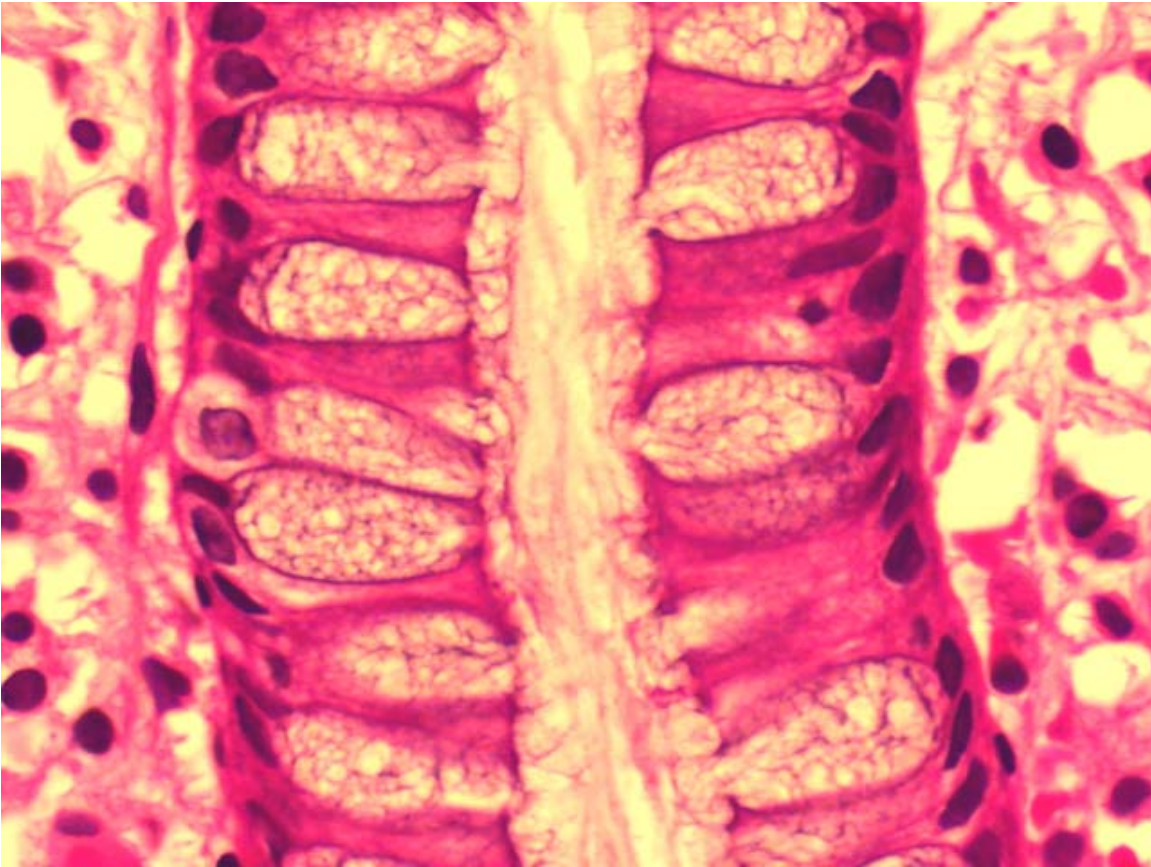


FIGURA 04. Campo microscópico de imagem digital de reto normal. HE, 500X. Caso n°/AP 224857

4.3.1.2 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DE TEXTURA NUCLEAR

As imagens foram capturadas e segmentadas de modo interativo por um observador treinado em citologia e arquivadas no computador sem compactação, preservando a

imagem de forma integral e em cópias em CD-ROM gravável. Em média, foram escolhidos e capturados aleatoriamente 20 a 30 campos das lâminas HE de cada caso dos grupos câncer e normal. As imagens capturadas foram revisadas e segmentadas extraindo-se os núcleos demarcados com o auxílio do programa Corel Draw 8 instalado e os núcleos foram arquivados em CD-Rom gravável e em disco rígido, criando-se um arquivo para cada caso. Foram criados 73 arquivos dos núcleos segmentados, representativos dos 51 casos de adenocarcinomas (grupo câncer) e 22 retos normais (grupo normal). As Figuras 05 e 06 mostram os arquivos de um caso de núcleos segmentados de adenocarcinoma, e reto humano normal, respectivamente.

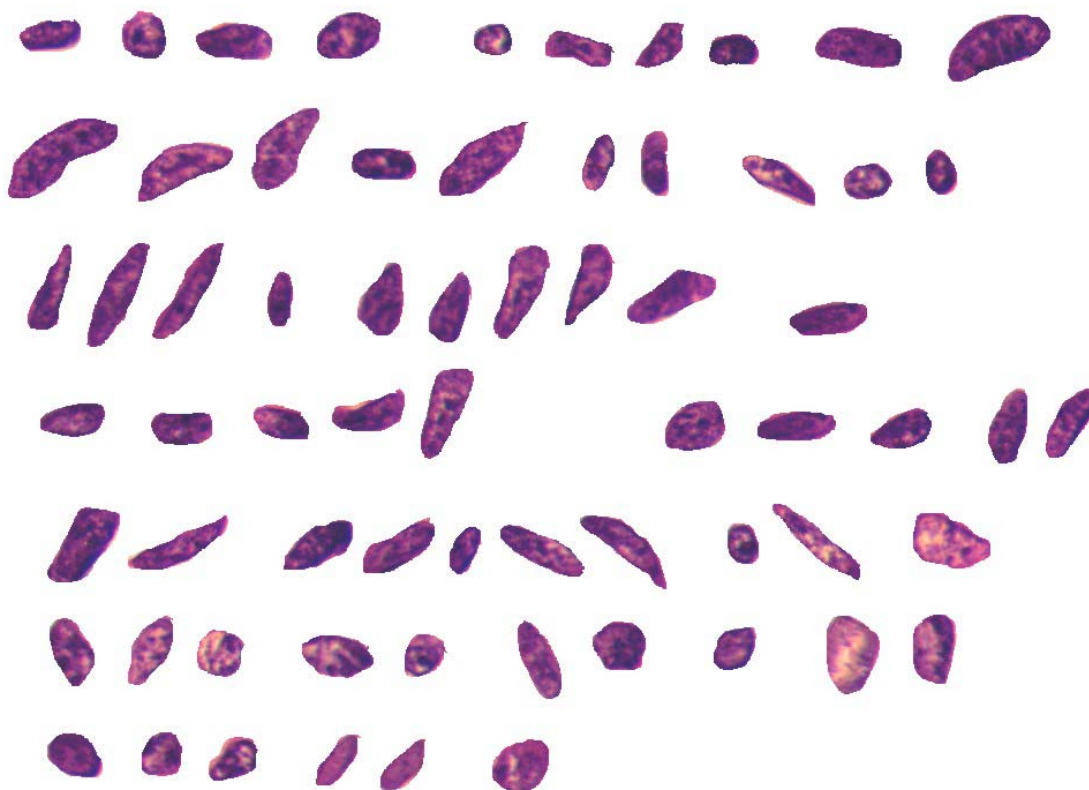


FIGURA 05. Arquivo de 66 núcleos segmentados de adenocarcinoma de reto. Caso n°/AP 192416

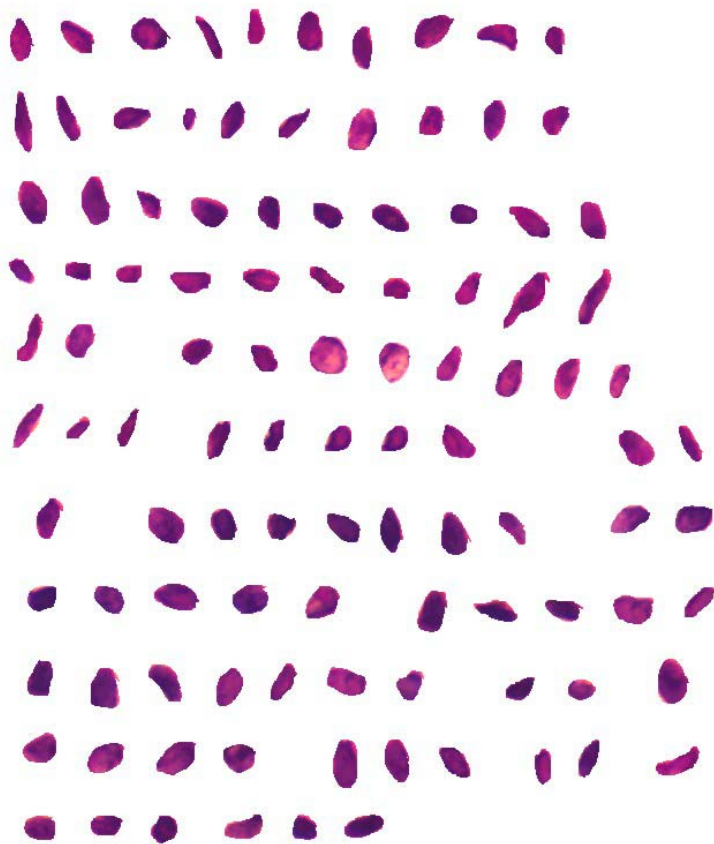


FIGURA 06. Arquivo de 106 núcleos segmentados de reto normal. Caso n°/AP 273633

As imagens de alta resolução (500X) foram aleatoriamente obtidas de células relacionadas às camadas basais, totalizando 6.001 núcleos celulares. O anexo 02 relaciona a origem dos núcleos dos casos estudados. Apenas o componente vermelho foi utilizado para aumentar o contraste dos cortes corados por hematoxilina e eosina. A resolução digital foi de cinco elementos de imagem por micrômetro, nas imagens de alta resolução.

Foram determinados dois conjuntos de núcleos para estudo, após revisão:

4.3.1.3 DEFINIÇÃO DOS CONJUNTOS DE NÚCLEOS ESTUDADOS

1. Conjunto de núcleos dos adenocarcinomas de reto. No grupo câncer foram capturadas imagens de 3.635 núcleos de células de adenocarcinoma de reto provenientes de 51 espécimes de pacientes operados, distribuídos conforme o estadiamento Dukes-Turnbull²⁸, em subconjuntos: com 710 núcleos de 10 casos (A); com 892 núcleos de 12 casos (B); com 1505 núcleos de 21 casos (C) e com 528 núcleos de oito casos (D).

2 . Conjunto de núcleos normais. No grupo normal foram capturadas imagens de 2.366 núcleos de células de áreas de tecido normal de reto provenientes de 22 espécimes de pacientes.

A Tabela 01 apresenta o sumário da origem dos 6.001 núcleos estudados.

Tabela 01. Conjuntos e subconjuntos de núcleos estudados

Conjunto	Nº total de núcleos	Subconjunto (estadiamento)	Nº de núcleos
Grupo câncer	3.635	A	710
		B	892
		C	1.505
		D	528
Grupo normal	2.366		
Total	6.001		

4.3.1.4 ASSINATURAS NUCLEARES - HISTOGRAMAS

A seguir serão descritos os procedimentos de obtenção de assinaturas nucleares, e mais adiante, alguns conceitos utilizados nesse trabalho.

As fórmulas matemáticas e algoritmos das 93 características inicialmente avaliadas da distribuição espacial e estatística da textura de cromatina nuclear, descritas e listadas detalhadamente no Anexo 03, utilizadas para obtenção das características nucleares estudadas, foram retiradas do Sistema TICAS, citado anteriormente, desenvolvido no laboratório de imagens biomédicas do Centro de Ciências Ópticas da Universidade do Arizona, nos Estados Unidos. Essas características morfométricas foram selecionadas em função de suas frequências de ocorrência em mais de 200 mil células de diferentes órgãos e tecidos, a partir do Sistema TICAS, que catalogou mais de 400¹¹² e cada uma delas foi identificada por um algarismo arábico.

Neste trabalho foram utilizadas inicialmente 93 características morfométricas, e por isso a numeração delas, nesse trabalho, é descontínua. Os 6.001 núcleos foram analisados por programa de análise digital Image Pro Plus, versão 4.1 media cybernetics, Silver Springs, EUA. Este programa aplicado às características nucleares deu origem aos valores, em unidades arbitrárias, dependentes das características em questão. Foram então geradas planilhas numéricas específicas para cada núcleo, sendo que as colunas representam as características nucleares envolvidas na investigação e as linhas correspondem aos valores encontrados em cada núcleo de cada caso verificado, conforme exemplificado, parcialmente, na Tabela 02.

TABELA 02. Exemplo de tabela parcial com valores das características nucleares dos núcleos segmentados de um caso

Núcleos	Área	Aspect	Density (mean)	Roundness	IOD	Fractal Density Dim. (min)	Density (max)	Margination	Heterogeneity	Clumpness	
1	728,0000	1,6618	90,4354	1,1730	65837,0000	1,0436	56,0000	159,0000	0,3648	0,1387	0,0000
2	338,0000	1,2797	74,3965	1,0899	25146,0000	1,0728	53,0000	164,0000	0,3921	0,0533	0,0000
3	460,0000	2,0670	87,4696	1,3525	40236,0000	1,0405	66,0000	169,0000	0,3975	0,1217	0,0000
4	411,0000	1,2241	82,1168	1,0280	33750,0000	1,0514	51,0000	165,0000	0,3807	0,1265	0,0000
5	434,0000	1,4088	94,2396	1,2134	40900,0000	1,0773	64,0000	128,0000	0,3623	0,0207	0,0000
6	684,0000	1,9710	87,5263	1,4551	59868,0000	1,0611	57,0000	153,0000	0,3959	0,2003	0,0000
7	393,0000	1,2555	81,7227	1,0751	32117,0000	1,0612	58,0000	135,0000	0,3666	0,0534	0,0000
8	683,0000	1,9063	79,0308	1,3880	53978,0000	1,0736	50,0000	143,0000	0,3939	0,0805	0,0000
9	757,0000	1,1526	98,4267	1,1667	74509,0000	1,0613	58,0000	165,0000	0,3706	0,1493	0,0000
10	1041,0000	4,3762	82,0010	2,1772	85363,0000	1,0881	53,0000	165,0000	0,3848	0,1143	0,0000
11	1087,0000	2,9065	77,2686	1,6657	83991,0000	1,0469	46,0000	169,0000	0,4022	0,1766	0,0052
12	744,0000	1,8453	86,2621	1,3156	64179,0000	1,0599	55,0000	255,0000	0,3454	0,0860	0,0000
13	1190,0000	3,4204	92,4924	1,8238	110066,0000	1,0832	55,0000	169,0000	0,3802	0,2118	0,0000
14	742,0000	1,8425	80,7386	1,3696	59908,0000	1,0487	50,0000	134,0000	0,3801	0,0728	0,0000
15	382,0000	1,4668	76,2408	1,1569	29124,0000	1,0699	55,0000	130,0000	0,3914	0,0393	0,0000
16	903,0000	1,8123	82,4618	1,2337	74463,0000	1,0409	51,0000	169,0000	0,4005	0,1872	0,0000
17	463,0000	1,3646	66,6458	1,3011	30857,0000	1,0587	49,0000	169,0000	0,4021	0,0972	0,0000
18	558,0000	1,5878	91,4158	1,2557	51010,0000	1,0780	49,0000	169,0000	0,4076	0,3154	0,0170
19	824,0000	1,3146	87,3483	1,1526	71975,0000	1,0547	61,0000	168,0000	0,3569	0,0971	0,0000
20	753,0000	1,5274	98,1793	1,2613	73929,0000	1,0591	56,0000	169,0000	0,3719	0,1886	0,0000
22	681,0000	1,1594	100,8076	1,0864	68650,0000	1,0558	67,0000	158,0000	0,3755	0,1101	0,0000
23	764,0000	2,0866	86,4280	1,3051	66031,0000	1,0607	56,0000	147,0000	0,3748	0,0903	0,0145
24	566,0000	1,1634	69,6060	1,1795	39397,0000	1,0749	50,0000	255,0000	0,4048	0,0972	0,0000
25	539,0000	1,3912	84,6271	1,1787	45614,0000	1,0581	53,0000	153,0000	0,3818	0,1447	0,0000

* Caso N°/AP 83671, com suas 11 características nucleares extraídas e seus valores em unidades arbitrárias. Tabela parcial de 25 dos 82 núcleos segmentados arquivados deste caso.

ASSINATURAS NUCLEARES

A assinatura digital gera um histograma representativo de características de textura da cromatina do núcleo por microscopia óptica convencional, e a assinatura digital é obtida através da análise de imagem computadorizada.

As 11 características descritivas da textura da cromatina nuclear selecionadas foram: Área, Aspecto (aspect), Densidade Média (density mean), Circularidade (roudnness), Densidade Óptica Total (IOD ou DOT), Dimensão Fractal (fractal dim.), Densidade Mínima (density min.), Densidade Máxima (density Max.), Condensação ou Marginação (margination ou condensation), Heterogeneidade (heterogeneity) e Granularidade (clumpness) nuclear. A assinatura nuclear representa graficamente conjuntos de características de textura de cromatina que permite ao observador reconhecer padrões e tendências de distribuição de valores. Os histogramas agrupam conjuntos de características, desde grandezas físicas como áreas até os resultados de funções e relações que representam aspectos morfológicos.

Conceitos e Definições Utilizados:

Distância média padronizada da população normal (dmpn)

As assinaturas digitais de núcleos celulares podem oferecer informações clinicamente 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 o escore z médio 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. Os valores das ordenadas dos histogramas nucleares passaram a ser valores z, expressos em unidades padronizadas de distância da população normal. A dmpn da população de referência, do grupo normal, tende a ser igual a zero. A média aritmética entre os valores z médios de todas as características mensuradas tem como resultado uma nova redução de dados, substituindo o histograma por um único valor, que é denominado de assinatura média nuclear, que representa o formato numérico das semelhanças ou diferenças das assinaturas nucleares.

Assinaturas de padrão histológico

As assinaturas de padrão histológico, também denominadas assinaturas de lesões, são histogramas cujas abscissas se estendem por escalas de valores dos z médios das características nucleares e as ordenadas com suas frequências relativas de ocorrência, sendo cada unidade dividida em cinco intervalos. Desta forma, 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 ou a categorias diagnósticas.

Outros conceitos utilizáveis

Fundamentais para a compreensão de imagens digitais, descritos a seguir.

Morfometria: Pode ser definida como a mensuração de estruturas por qualquer método; inclui procedimentos planimétricos e estereológicos. Conceito utilizado neste trabalho. Prefixo micro quando aplicados à microscopia. Morfometria e fotometria fornecem a base para a quantificação em Biologia¹²², e a morfometria é utilizada para medir tamanho, área e textura em estruturas teciduais^{133,142}.

Planimetria: é o termo utilizado para mensurações geométricas limitadas a duas dimensões¹¹⁵.

Esterologia: é o conjunto de técnicas usadas para obtenção de informações quantitativas sobre características geométricas com sistema de testes de dimensão menor que o objeto ou estrutura estudados¹²². Obtém dados tridimensionais a respeito de estruturas microscópicas a partir de cortes histológicos.

Citometria: é a mensuração de características citoquímicas, histoquímicas ou moleculares de células e tecidos, sendo baseada principalmente no estudo da densidade óptica de estruturas¹¹⁵.

Cariometria: é a mensuração de características do núcleo celular¹¹⁶.

Fotometria nuclear: estuda a densidade óptica dos elementos nucleares com a microscopia óptica convencional¹¹⁵.

Assinatura digital: é a denominação dada para um histograma contendo um determinado conjunto de características que representam a organização da cromatina nuclear obtida pela análise digital das imagens da microscopia óptica convencional¹¹⁵.

Digitalização e análise de imagem digital: consiste na transformação da imagem obtida na microscopia óptica em informação numérica que será analisada por um sistema de computador¹¹⁵.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise descritiva foram utilizados para as variáveis quantitativas: média aritmética, desvio padrão (dp), valores máximos e mínimos, e mediana, e para as variáveis qualitativas (categóricas), percentuais, onde aplicáveis.

A análise da sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier (produto-limite)¹⁴³, com utilização de curvas, com comparação entre grupos pelo teste de log-rank¹⁴⁴.

Foram usados em variáveis quantitativas o teste t de Student, em situações de assimetria o teste U de Mann-Whitney, e nas variáveis categóricas o teste Qui-quadrado de Pearson para comparar as características clínico-patológicas e de assinatura nuclear digital entre os grupos com ocorrência de óbito e de não óbito (vivos) no período de seguimento de 5 anos, para testar o impacto dos fatores de prognóstico^{144,145}.

Na consideração do efeito simultâneo dos diversos fatores estudados sobre a ocorrência de óbito, utilizou-se a técnica de regressão multivarável de Cox¹⁴⁶, onde é possível obter estimativas ajustadas de associação. Esta análise foi realizada em duas etapas: a primeira, incluindo as variáveis que alcançaram significância estatística clássica na análise bivariada, e que não estivessem descritas nos parâmetros da classificação de estadiamento clínico-patológico. A segunda comparou as variáveis de reconhecida importância biológica¹⁴⁶ e as características mais significativas das assinaturas nucleares para identificar aquelas variáveis que poderiam adicionar ao estadiamento tumoral, informação quanto ao prognóstico da doença ou o efeito independente de fatores individuais na sobrevida. A análise bivariada foi utilizada essencialmente e em conjunto com achados da literatura para selecionar as variáveis que seriam incluídas nos modelos de regressão multivariada de Cox.

Um valor de P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. No modelo de Cox o nível de significância utilizado foi de $\alpha = 0,10$ e um intervalo de confiança de 90%.

Para avaliação dos resultados das assinaturas digitais: Os algoritmos para os métodos estatísticos utilizados foram implementados nos programas de computador baseados no Sistema TICAS¹¹² do Centro de Ciências Ópticas da Universidade do Arizona, Tucson, AZ, EUA). Para a seleção das 11 características nucleares mais discriminantes ou discrepantes de cada categoria diagnóstica, grupo câncer e grupo normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis^{143,144}. Inicialmente todas as 11 características nucleares foram descritas através de média e desvio padrão. Os grupos normal e câncer foram comparados entre si, obtendo-se estimativas do tamanho de efeito padronizado (TEP)¹⁴⁷ igual: (média do grupo câncer - média do grupo normal) / desvio padrão comum, com significância determinada pelo teste t de Student para amostras independentes. Na comparação entre os grupos considerados pelo estadiamento, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), com localização de diferenças através do procedimento de Duncan^{145,148}.

Para a avaliação da distribuição das 11 características nucleares, optou-se por calcular o escore z de cada uma. O grupo referencial para obtenção do escore z foi o grupo normal. Assim, de posse da média e do desvio padrão de cada característica do grupo normal, calculou-se o escore z destas características nos pacientes do grupo com adenocarcinoma.

A seguir foram elaborados três tipos de gráficos: 1. assinatura nuclear; 2. Assinatura de padrão histológico e 3. distribuição da densidade óptica total (IOD ou DOT):

1. A assinatura nuclear foi representada por um histograma com o valor médio de z obtido em cada variável para cada característica. Características com valores de z negativos foram excluídas, por convenção do Sistema TICAS.

2. A assinatura de padrão histológico ou assinatura de lesão. Trata-se de um histograma para a média combinada de todos os escores z , também chamada de assinatura média nuclear, das características estudadas. Este escore z médio pode ser utilizado como um sumador global do histograma de assinatura nuclear, (descrito no item anterior). No entanto, é também preconizada sua utilização em outro tipo de histograma conhecido como histograma de assinatura histológica, cujos procedimentos são descritos seguir. O escore z é fracionado em diversas classes, sendo que para cada unidade de z são adotados 5 categorias. Este histograma foi interrompido no nível $z = 6$ contando então com 30 categorias. Neste caso também foram seguidas algumas regras especiais: (1) somente são representados nos gráficos os valores positivos de z e (2) são incluídos na primeira categoria todos os valores negativos de z .

3. O gráfico da distribuição da DOT ou IOD, mais uma vez trata-se de um histograma onde a variável é categorizada em uma série de classes e os valores de frequência relativa são apresentados.

A comparação das assinaturas médias e as 11 características nucleares entre o grupo normal e os vivos sem doença e os óbitos em 5 anos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) com a localização das diferenças pelo procedimento de Duncan^{145,148}.

O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

Os dados foram processados e analisados com auxílio do programas de computador Epi Info 2000 versão 1.0 e Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows, versão 10.0. Cálculos adicionais foram realizados através de programa de computador Microsoft Excel 97 e Windows 2000 (Microsoft, Redmont, WA, EUA). Os gráficos foram realizados com o auxílio do programa Sigma Plot, versão 2.0.

4.5 ÉTICA

O presente estudo foi avaliado pela Comissão de Ética do HCPA, Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG/HCPA), tendo sido aprovado no processo-protocolo de número 00.141, e encontra-se no Anexo 04.

5.0 RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS GENÉRICAS DA AMOSTRA

A amostra estudada foi constituída de 73 pacientes, a média de idade ($\pm dp$) foi de 56,6 ($\pm 14,0$) anos, mínima de 30 e máxima de 82 anos. Trinta (41,1%) pacientes eram do sexo masculino e 43 (58,9%) do sexo feminino. A Tabela 03 mostra os valores quanto a idade e sexo dos dois grupos.

TABELA 03. Características genéricas dos grupos

Variável	Grupo Câncer	Grupo Normal	P
Média de idade, anos (dp)	59,9 ($\pm 13,0$)	49,1 ($\pm 13,4$)	0,87
Idade, mínima-máxima	30 – 82	30 – 75	
Sexo feminino N° (%)	28 (54,9)	15 (68,2)	0,87
Idade mediana	63	48,5	

As demais descrições a seguir referem-se ao grupo câncer, constituído de 51 pacientes operados de adenocarcinoma de reto, estando suas características genéricas principais expressas na Tabela 04.

TABELA 04. Características dos adenocarcinomas de reto

Variável	Valores	N	%
Local médio-cm margem anal (dp)	6,19 (±3,14)		
Grau diferenciação histológica			
Bem diferenciado		7	13,7
Moderadamente diferenciado		40	78,5
Pouco diferenciado		4	7,8
Tipo mucoprodutor		6	11,8
Linfonodos			
Média isolados (mínimo-máximo)	15,86 (2 – 48)		
Média positivos (mínimo-máximo)	3,82 (1 – 22)		
CEA pré-operatório			
Valor médio (mínimo – máximo)	29,70 (0,5 - 611,0)	44	86,2
Estágio Dukes-Turnbull (núcleos)			
A (710)		10	19,6
B (892)		12	23,5
C (1.505)		21	41,2
D (528)		8	15,7

Quanto às **características do tumor**, sua localização no reto em média foi a 6,1 cm. da margem anal, sendo que 32 tumores (62,7%) localizavam-se até 7,0 cm da margem anal. O grau de diferenciação histológica dos tumores foi de 40 (78,4%) classificados como moderadamente diferenciado. O tipo mucoprodutor foi encontrado em seis tumores (11,8%). A invasão venosa ocorreu em dois (3,9%) tumores e a invasão neural ocorreu em um (1,9%) tumor.

A extensão da penetração do tumor na parede do reto ocorreu até a serosa ou adventícia em 25 casos (49,0%) e o estadiamento tumoral demonstrou que a maioria dos tumores estava em fase avançada da doença, sendo 21 (41,2%) no estágio C e oito (15,7%) no estágio D, com doença metastática distante no momento da cirurgia. O fígado e o pulmão foram os sítios mais freqüentemente acometidos por metástases em cinco (62,5%) e dois (25,0%) casos respectivamente, seguidos por implante peritoneal em um (12,5%) caso. O número de linfonodos encontrados nas peças cirúrgicas variou de dois a 48, em média 15,70 ($\pm 15,8$) por caso. Vinte e oito pacientes (54,9%) apresentaram linfonodos positivos para adenocarcinoma de reto, e o número de linfonodos positivos variou de um a 22, com média de 3,8 ($\pm 6,0$) por caso.

A **cirurgia** mais realizada foi a amputação abdominoperineal de reto (AAP), em 33 casos (64,7%) e as cirurgias de preservação esfíncteriana em 17 (35,3%), discriminadas na Tabela 05.

TABELA 05. Procedimentos cirúrgicos realizados

Tipo de cirurgia	N	%
Amputação abdominoperineal	33	64,7
Retossigmoidectomia manual	8	15,7
Retossigmoidectomia grampeada	9	17,6
Retossigmoidectomia à Hartmann	1	2,0
	Total	51
		100,0
Curativas	39	76,5

Em 39 pacientes (76,5%) as cirurgias foram consideradas curativas, e em 12 (23,5%) paliativas por apresentarem metástases distantes em oito casos e/ou margem circunferencial da peça cirúrgica comprometida pelo tumor ao exame AP em quatro casos.

O **tratamento complementar** com rádio ou quimioterapia, ou ambos, no pós-operatório foi realizado em 12 (29,2%) pacientes, e como tratamento complementar adjuvante pós-operatório foi realizado em 10 casos (34,4%) submetidos a cirurgias curativas, excluindo-se os casos Dukes A.

Nos 39 pacientes submetidos à cirurgia curativa, a **recidiva** ocorreu em 19 (48,7%), sendo em cinco (12,8%) recidivas locorregional, e em 14 (35,9%) recidivas distante. Dos casos com metástases à distância, oito pacientes (15,6%) as apresentavam no momento da cirurgia e 14 (32,5%) as desenvolveram no período pós-operatório, totalizando 22 casos (43,1%) de metástases distantes. Estas lesões estavam situadas no fígado em 10 casos (45,5%); no pulmão em 10 (45,5%); um (4,5%) óssea e na superfície peritoneal em um (4,5%). Em 11 pacientes (21,5%) dos 51 operados, as metástases distantes ocorreram em

mais de um local, correspondendo a 50% dos pacientes que apresentam metástases distantes.

O tratamento da doença não curativa ou metastática no momento da cirurgia ou recidivante em 5 anos, totalizando 30 pacientes, foi realizado em 20 (66,6%) deles, nos quais foram realizadas cinco reoperações, 11 quimioterapias e/ou sete radioterapias. As cinco recidivas locorregionais, nos 39 casos de cirurgias curativas ocorreram em três casos classificados como Dukes C (60%), um no estágio A e um no B. A recidiva distante ocorreu em 14 casos, sendo 10 (71,4%) em casos Dukes C; dois no A e dois no B. A reoperação foi realizada em cinco (16,7%) casos de recidiva.

O tempo de **sobrevida livre de doença** dos pacientes submetidos à cirurgia curativa variou entre 3 e 59 meses, com média (dp) de 19,9 ($\pm 15,0$) meses, sendo que em 78,5% dos casos as recidivas aconteceram nos dois primeiros anos de pós-operatório.

Após 5 anos de acompanhamento pós-cirúrgico, do total de 51 (grupo câncer) pacientes operados, 23 (45,1%) estavam vivos, estando 21 sem doença (41,1%) e dois (3,9%) pacientes vivos com doença metastática e 28 (54,9%) foram ao óbito pela doença.

A sobrevida (SV) média foi de 41 ($\pm 2,86$) meses, mediana 40,33, com tempo mínimo de 3 e máximo de 60 meses, tendo o óbito ocorrido em tempo mínimo de 3 e máximo de 53 meses. A sobrevida do grupo câncer em 60 meses está representada na Figura 07.

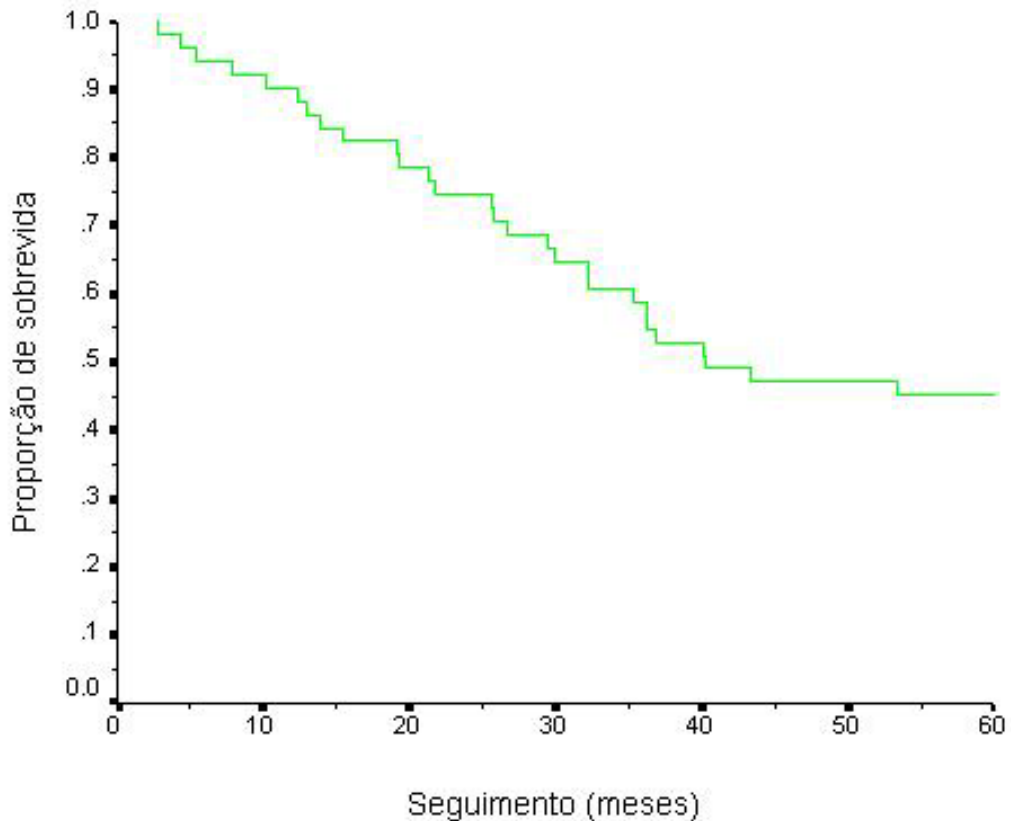


FIGURA 07. Curva de sobrevida global em meses

A sobrevida distribuída nos estágios de Dukes-Turnbull está representada na Figura 08. As percentagens de pacientes vivos em 5 anos foram: grupo A, de 80% com média de 56,38 ($\pm 2,87$) meses; no grupo B de 66,6%, com média de 48,43 ($\pm 5,31$) meses; no grupo C de 33,3%, com média de 38,83 ($\pm 4,13$) meses e no grupo D de zero%, com média de 16,33 ($\pm 3,97$) meses.

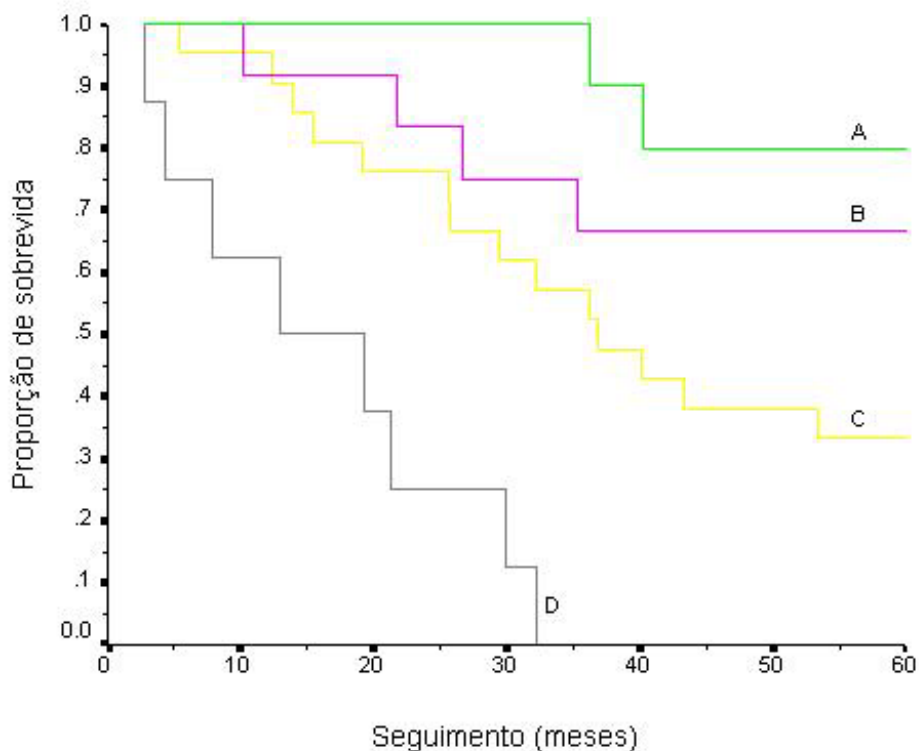


FIGURA 08. Curva de sobrevivência por estágios de Dukes-Turnbull

Analisando os 39 casos de **cirurgias curativas**, a SV média em 5 anos foi de 47,4 ($\pm 2,75$) meses, com tempo mínimo de 5 e máximo de 60 meses, tendo o óbito ocorrido em tempo mínimo de 5 e máximo de 53 meses. Ao final de 5 anos, 22 pacientes estavam vivos (56,4%), estando dois (5,1%) com doença metastática, e 17 indo ao óbito pela doença (43,6%).

A SV em 5 anos nas 12 **cirurgias paliativas** (8,3%) foi de 3 a 60 meses com tempo médio de 19,0 ($\pm 15,6$) meses. Um paciente com limite radial comprometido no exame AP fez tratamento complementar com radio-quimioterapia pós-operatória e sobreviveu 60 meses. Nestes pacientes os óbitos ocorreram em 91,7% num período entre 3 e 32

meses de pós-operatório. A Figura 09 apresenta o gráfico da sobrevida nas cirurgias curativas e não curativas.

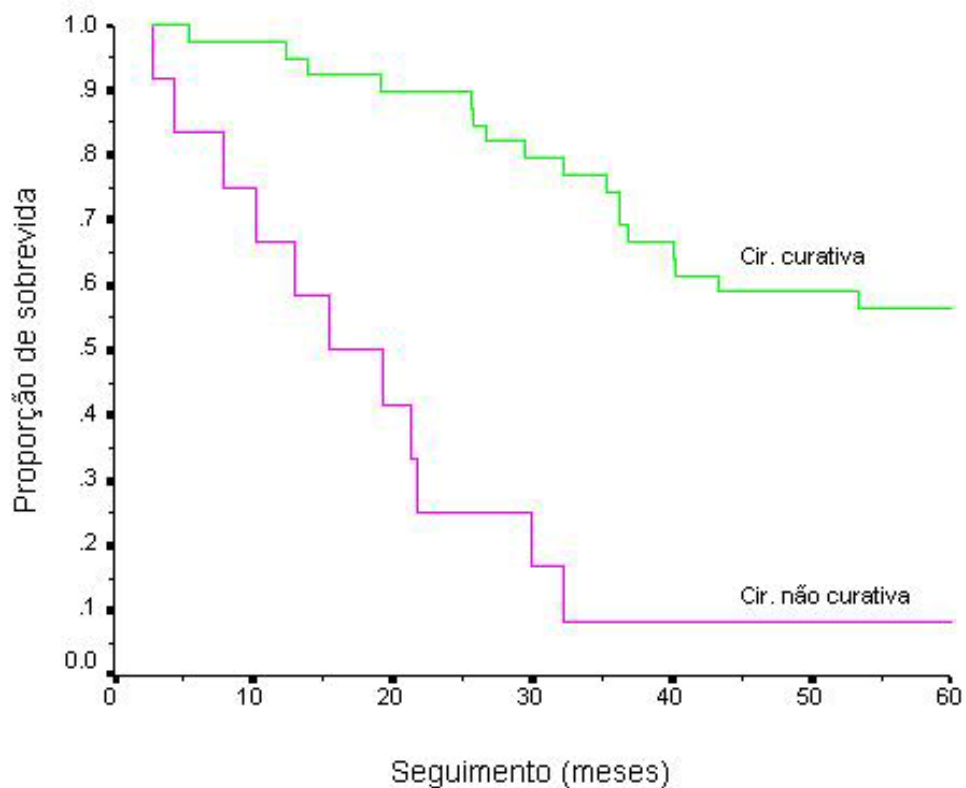


FIGURA 09. Curva de sobrevida nas cirurgias curativas e não curativas

O **óbito**, ocorreu nos 5 anos de seguimento, em 28 (54,9%) pacientes, todos determinados pela doença, sendo em 17 (43,6%) pacientes dentre os 39 submetidos a cirurgia curativa.

Ao final de 5 anos dos 39 pacientes submetidos a cirurgias curativas: 20 (51,3%) estavam vivos sem doença; dois (5,1%) estavam vivos com doença metastática e 17 (43,6%) foram ao óbito pela doença. Ao final dos 5 anos dos 51 pacientes operados: 21 (41,1%) estavam

vivos sem doença; dois (3,9%) estavam vivos com doença metastática e 28 (54,9%) foram ao óbito pela doença.

O CEA pré-operatório, avaliado em 44 (78,4%) dos 51 pacientes operados variou de 0,5 a 611,0 ng/ml, com valor médio de 29,7 ($\pm 98,3$). Os valores do CEA em 16 pacientes (36,4%) estavam normais, (até 3 ng/ml); em 11 (25,0%) em valores de 3,1 a 5,0 ng/ml; em seis (13,6%) em valores de 5,1 a 10,0 ng/ml e em 11 (25,0%) em valores superior a 10,0 ng/ml. No estágio D, os (oito) casos com metástases sincrônicas apresentavam valores médios do CEA de 59,2 ng/ml, estando em quatro casos (50,0%) acima de 10,0 ng/ml.

CARACTERÍSTICAS DAS ASSINATURAS DIGITAIS

Os 6.001 núcleos individualizados foram estudados nas assinaturas nucleares digitais, provenientes dos 73 arquivos separados, com média de 82,20 ($\pm 18,6$) núcleos de cada caso: 3.635 núcleos do grupo câncer (60,5%), com média de 71,2 ($\pm 9,2$) por caso, mínimo de 56 e máximo de 95, mediana 68,0 e 2.366 núcleos do grupo normal (39,4%), com média de 107,5 ($\pm 4,6$) por caso, mínimo de 101 e máximo de 120, mediana 106,5.

As 11 características nucleares da textura da cromatina nuclear (descritas com detalhes no Anexo 03) mais relevantes ao estudo foram (nome e n°. no Sistema TICAS): **1.** Área do núcleo (area=2); **2.** Aspecto (Aspect = não tem número correspondente no Sisrema TICAS); **3.** Densidade Média (Mean Density=317); **4.** Circularidade nuclear (Roundness=3); **5.** Densidade Óptica total (IOD ou DOT=1) ; **6.** Dimensão Fractal (Fractal Dimension=400); **7.** Densidade Mínima (Minimum Density=316); **8.** Densidade Máxima (Maximum Density=318); **9.** Marginação ou Condensação (Margination ou

Condensation=315); **10.** Heterogeneidade de Densidade Óptica (Heterogeneity=312); **11** Granularidade Nuclear ou compactação (clumpness=314).

As médias das características utilizadas na geração das assinaturas nucleares digitais, e a comparação entre o grupo câncer e o normal, estão apresentadas na Tabela 06.

TABELA 06. Comparação das médias das características cariométricas entre o grupo câncer e o grupo normal

(NºTICAS)*	Variável	CÂNCER Média(dp)	NORMAL Média(dp)	TEP†	P	Associação
(2)	Área	1203,662 (±250,508)	500,605 (±63,703)	3,30	<0,001	Muito grande
(1)	DOT ou IOD‡	92144,6 (±24619,8)	34597,4 (±4580,5)	2,77	<0,001	Muito grande
(400)	DimensãoFractal	1,061 (±0,003)	1,064 (±0,002)	1,09	<0,001	Moderada
(316)	DensidadeMínima	38,194 (±14,010)	50,987 (±5,770)	1,05	<0,001	Moderada
(ND) §	Aspecto	1,686 (±0,210)	1,859 (±0,184)	0,85	0,001	Moderada
(315)	Condensação	321,123 (±95,589)	385,630 (±9,025)	0,80	<0,001	Moderada
(314)	Granularidade	21,130 (±32,763)	1,067 (±1,395)	0,73	<0,001	Moderada
(317)	DensidadeMédia	73,309 (±18,016)	68,434 (±7,155)	0,50	0,009	Pequena
(3)	Circularidade	1,273 (±0,076)	1,302 (±0,070)	0,39	0,134	Pequena
(318)	DensidadeMáxima1	140,898 (±36,238)	134,000 (±12,643)	0,22	0,234	Pequena
(312)	Heterogeneidade	80,776 (±97,906)	65,044 (±15,968)	0,19	0,270	Pequena

* (Nº TICAS) = número correspondente no Sistema TICAS

†TEP = Tamanho do Efeito Padronizado

‡DOT ou IOD = Densidade Óptica Total

§ (ND) Aspecto – número não disponível no Sistema TICAS

Das 11 características estudadas e comparadas, as diferenças destacaram-se principalmente em relação à Área e à DOT. No grupo intermediário, observa-se a Densidade Mínima, Aspecto, Marginação e Granularidade e Dimensão fractal. As variáveis de menor força de associação foram, Densidade Média, Circularidade, Densidade Máxima e Heterogeneidade,

que segundo nossa análise não apresentam relevância na discriminação de células cancerosas e normais.

A comparação das médias das 11 características entre o normal e o estadiamento encontra-se demonstrada na Tabela 07.

TABELA 07. Comparação das médias das características cariométricas entre o grupo normal e o estadiamento

Variável	Normal	A†	B†	C†	D†	P
Área	500,6 ^a	1126,0 ^b	1338,9 ^{a,c}	1181,8 ^{b,c}	1155,2 ^b	<0,001
Aspecto	1,8 ^c	1,7 ^c	1,7 ^{b,c}	1,6 ^{a,b}	1,5 ^a	0,001
Densidade Média	68,4 ^{a,b}	64,5 ^a	79,2 ^b	80,4 ^b	75,8 ^{a,b}	0,02
Circularidade	1,3 ^b	1,3 ^b	1,2 ^{a,b}	1,2 ^{a,b}	1,2 ^{a,b}	0,07
DOT ou IOD	34597,4 ^a	78971,7 ^b	104607,5 ^c	92808,2 ^{b,c}	88174,6 ^{b,c}	<0,001
Dimensão Fractal	1,0 ^b	1,0 ^b	1,0 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	<0,001
Densidade Mínima	50,9 ^c	30,7 ^a	38,4 ^{a,b}	41,3 ^b	38,6 ^{a,b}	<0,001
Densidade Máxima	134,0 ^{a,b}	117,3 ^a	147,3 ^b	144,3 ^b	151,5 ^b	0,80
Condensação	385,6 ^b	310,9 ^a	346,5 ^{a,b}	298,6 ^a	354,7 ^{a,b}	0,009
Heterogeneidade	65,0 ^a	46,8 ^a	110,1 ^a	79,8 ^a	81,3 ^a	0,444
Granularidade	1,0 ^a	11,6 ^a	37,6 ^b	20,1 ^{a,b}	10,9 ^a	0,006

* Médias indicadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha = 5\%$)

† A, B, C, D = Estadiamento

As diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre o grupo normal e os estágios de Dukes-Turnbull ocorreram entre as características Área, Aspecto, Densidade Média, Densidade Óptica Total, Dimensão fractal, Densidade Mínima, Marginação e Granularidade. As demais características não diferiram entre si nas comparações entre os grupos avaliados, como apresentado na Tabela 07. As médias das características Área, DOT, Dimensão Fractal, Densidade Mínima do grupo normal diferiram estatisticamente de todas dos subgrupos A, B, C e D do estadiamento. As médias das características Densidade Média, Densidade Máxima e Heterogeneidade do grupo normal e dos subgrupos A, B, C e D não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan.

Foram verificadas as diferenças das características pela comparação das médias do grupo normal, subgrupos vivos sem doença e óbitos em 5 anos de seguimento, apresentadas na Tabela 08.

TABELA 08. Comparação das médias das características cariométricas entre o grupo normal, subgrupos vivos sem doença e óbitos em 5 anos de seguimento

Variável	Normal	Vivos	Óbitos	P
Área	500,6 ^a	1210,9 ^b	1198,7 ^b	<0,001
Aspecto	1,8 ^b	1,7 ^a	1,6 ^a	<0,001
Densidade Média	68,4 ^a	73,6 ^{a,b}	78,1 ^b	0,103
Circularidade	1,3 ^b	1,2 ^{a,b}	1,2 ^a	0,034
DOT ou IOD	34597,4 ^a	87559,5 ^b	95705,7 ^b	<0,001
Dimensão Fractal	1,0 ^b	1,0 ^a	1,0 ^a	<0,001
Densidade Mínima	50,9 ^c	33,7 ^a	40,9 ^b	<0,001
Densidade Máxima	134,0 ^{a,b}	128,2 ^a	151 ^b	0,022
Condensação	385,6 ^b	329,6 ^a	325,0 ^a	0,009
Heterogeneidade	65,0 ^a	58,6 ^a	100,1 ^a	0,161
Granularidade	1,0 ^a	15,2 ^{a,b}	26,6 ^b	0,007

* Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha = 5\%$)

Nove das 11 as características diferiram entre si nestes grupos comparados, normal, vivos sem doença e óbitos em 5 anos, com exceção das características Densidade Média e Heterogeneidade. Todas as médias das características do grupo normal, com exceção da Densidade Máxima e Heterogeneidade, diferiram das do subgrupo dos óbitos e seis características diferiram das do subgrupo vivos sem doença, conforme exposto na Tabela 08. As médias das características dos subgrupos vivos sem doença e óbitos só diferiram entre si na Densidade Mínima e Máxima, pelo teste de Duncan. Em síntese, as médias das

características do grupo normal diferiram da dos vivos sem doença e da dos óbitos, embora os dois últimos subgrupos não tenham diferido estatisticamente entre si.

A seguir foram elaborados os histogramas de assinaturas nucleares.

A Figura 10 apresenta o histograma de assinatura nuclear do grupo câncer, a partir de 3.635 núcleos dos 51 pacientes. Das 11 características, seis tiveram valores de z médio positivos, sendo a Granularidade Nuclear e a DOT que tiveram maiores valores, e a seguir a Área.

A Figura 11 apresenta o histograma de assinatura nuclear de um caso normal para exemplificação (AP-273218) e dos casos provenientes dos núcleos dos subgrupos dos estágios A (710 núcleos, n= 10), B (892 núcleos, n= 12), C (1505 núcleos, n=21) e D (528 núcleos, n=8) de Dukes-Turnbull, respectivamente com n° de núcleos e n° de pacientes em cada um, entre parênteses. Nota-se que o valor z médio ou dmpn do normal está uniformemente próximo do valor zero, sendo nove destes positivos. O maior foi no máximo de 0,3 mostrando clara diferença em comparação com todos os estágios do grupo câncer apresentado nesta figura. A assinatura que mais se distanciou do normal foi a do estágio B, com valores z médios mais elevados, principalmente nas características Granularidade Nuclear, DOT e Área. Estas características foram as que mais se destacaram também nos outros estágios.

A Figura 12 apresenta o histograma de assinatura nuclear digital do subgrupo de pacientes, após 5 anos de seguimento, que permaneceram vivos sem doença (n=21). Também aqui, as características de maior destaque foram Granularidade Nuclear, DOT e Área, como fica evidente no histograma de representação.

A Figura 13 mostra o histograma de assinatura nuclear digital dos pacientes que faleceram em decorrência da doença (n=28). Neste histograma, nota-se maiores elevações dos valores de z médio, principalmente nas três características citadas anteriormente, e apareceram com valores positivos outras quatro características, o que diferencia ainda mais o subgrupo dos vivos sem doença, deste subgrupo dos óbitos pela doença.

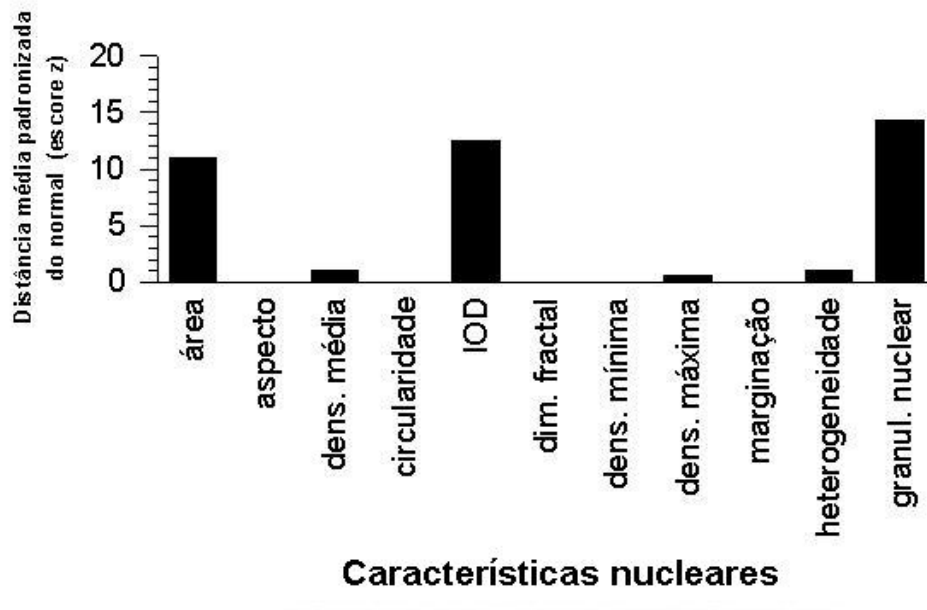


FIGURA 10. Assinatura nuclear do grupo câncer

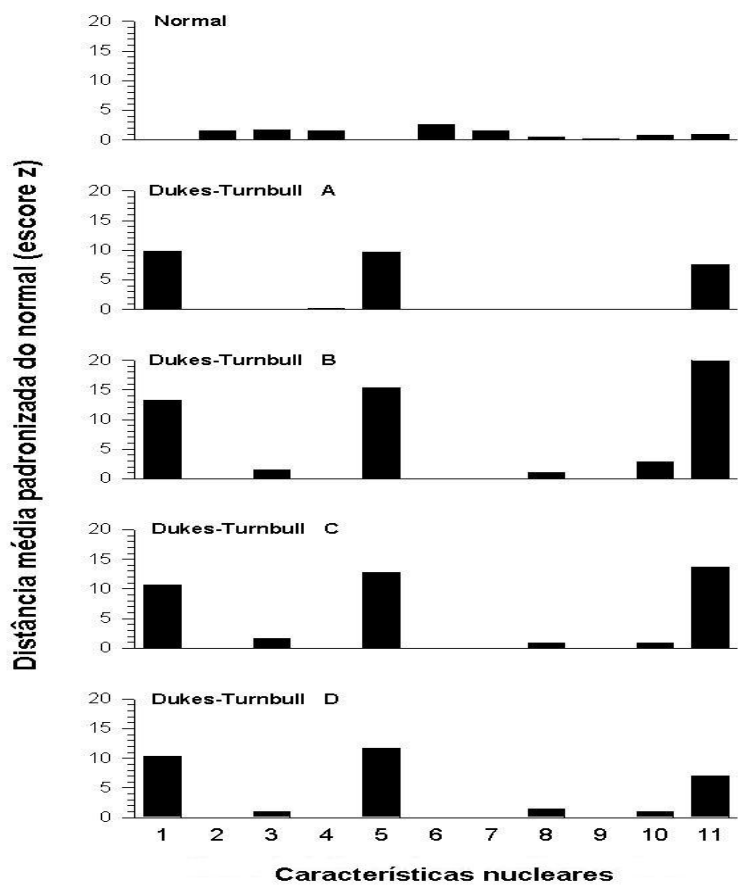


FIGURA 11. Assinaturas nucleares do normal e dos estágios de Dukes-Turnbull

* A distribuição das características numeradas de 1 a 11 segue a mesma ordem da Figura 10.

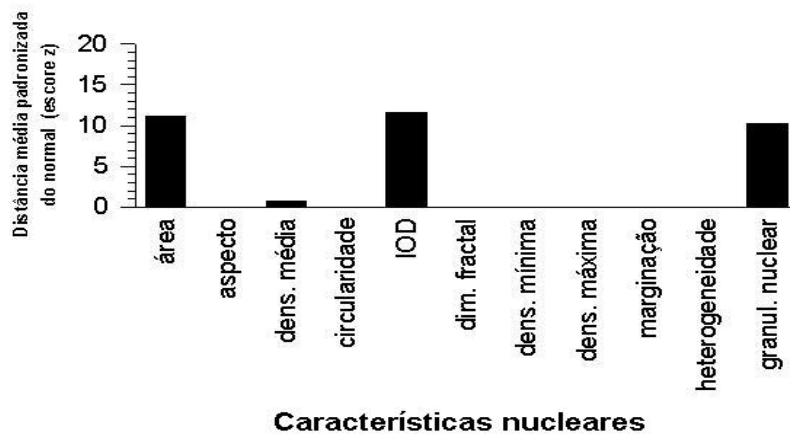


FIGURA 12. Assinatura nuclear do subgrupo vivos sem doença

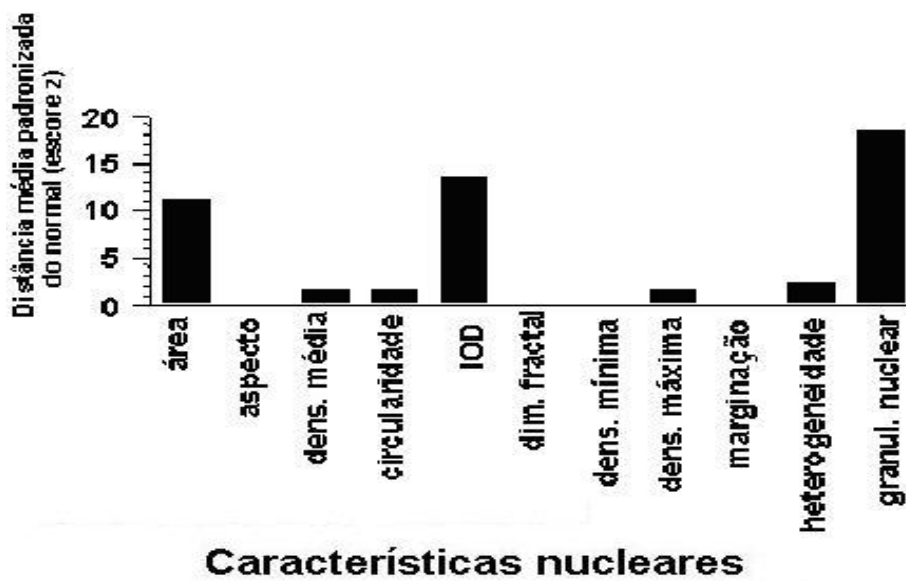


FIGURA 13. Assinatura nuclear do subgrupo óbitos

As assinaturas médias nucleares foram calculadas, sendo comparadas entre os diferentes grupos e subgrupos em estudo.

A comparação da assinatura média nuclear entre o grupo câncer com total de 3.635 núcleos e o normal com total de 2.366 núcleos encontra-se na Tabela 09.

TABELA 09. Comparação das assinaturas médias nucleares entre o grupo normal e câncer

Variável	Normal	Câncer	P
Assinatura média	0,0009	2,5928	0,001
Desvio padrão	(±0,37)	(±3,15)	

Houve diferença estatisticamente significativa entre a assinatura média nuclear do grupo normal e a do grupo câncer ($P=0,001$), sendo a diferença do câncer para o normal igual a 2,5919.

As comparações das diferenças entre as assinaturas médias nucleares entre o grupo normal e entre os subgrupos do estadiamento de Dukes-Turnbull, encontram-se na Tabela 10.

TABELA 10. Comparação das assinaturas médias nucleares entre o grupo normal e o estadiamento

Variável	Normal	A †	B †	C †	D †	P
Assinatura Média	0,0009 ^a	0,9681 ^{a,b}	4,6185 ^c	2,3957 ^b	2,1025 ^{a,b}	0,001
Desvio Padrão	(±0,37)	(±2,14)	(±4,33)	(±2,83)	(±1,30)	

* Médias indicadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan

($\alpha = 5\%$)

†Estadiamento

Houve diferença entre as assinaturas médias do grupo normal e as dos subgrupos do estadiamento ($P < 0,001$). As assinaturas que diferiram entre si foram; a assinatura média nuclear do subgrupo B que diferiu de todas as outras categorias diagnósticas, o subgrupo C que diferiu do normal e do grupo B. A assinatura média nuclear que mais se afastou do normal foi a do subgrupo B, com diferença igual a 4,6176.

Foi realizada a comparação entre a assinatura média do grupo normal e a dos pacientes que estavam vivos sem doença e a dos óbitos ocorridos pela doença no final de 5 anos de seguimento, que está apresentada na Tabela 11.

TABELA 11. Comparação das assinaturas médias nucleares entre o grupo normal, vivos sem doença e óbitos

Variável	Normal	Vivos	Óbitos	P
Assinatura Média	0,0009 ^a	1,9152 ^b	3,2618 ^b	<0,001
Desvio padrão	(±0,37)	(±2,98)	(±3,24)	

* Médias indicadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan

($\alpha = 5\%$)

As assinaturas médias dos pacientes com câncer que permaneceram vivos sem doença ou que faleceram pela doença em 5 anos de acompanhamento não diferiram entre si, mas ambos os subgrupos diferiram do grupo normal ($P < 0,001$), sendo esta diferença mais intensa nos núcleos do subgrupo óbito, igual a 3,2591 e nos núcleos do subgrupo vivos de 1,9143 em relação aos núcleos normais.

A seguir serão apresentados os histogramas das assinaturas digitais de padrão histológico. Na assinatura de padrão histológico do grupo câncer, apresentada na Figura 14, a proporção de valores de z médio vai se distanciando progressivamente do normal, alcançando valores na escala próximos a 6,0 em aproximadamente 15% dos pacientes.

A Figura 15 mostra a assinatura de padrão histológico do caso normal citado anteriormente e dos subgrupos A, B, C e D dos estágios de Dukes-Tunbull. O normal com concentração de valores que ficaram próximos do valor zero e menores que 1,0 e aglomerados juntos ao eixo das ordenadas. No estágio A distribuíram-se semelhante ao normal; no B a concentração afastou-se do normal, com pico de 40% nos valores 4,2. No C

e no D distanciaram-se em valores mais elevados que o normal, porém com distribuição mais uniforme.

A Figura 16 demonstra a assinatura digital de padrão histológico dos pacientes que permaneceram vivos sem doença em 5 anos de seguimento. Observa-se que neste grupo é alta a concentração de valores próximo ao normal, com valores baixos, menores que 1,0 assemelhando-se com o normal.

Na Figura 17, com histogramas de padrão histológico dos pacientes que faleceram pela doença nos 5 anos de seguimento, observa-se que há uma distribuição uniforme dos valores z médios, distanciando-se progressivamente do normal.

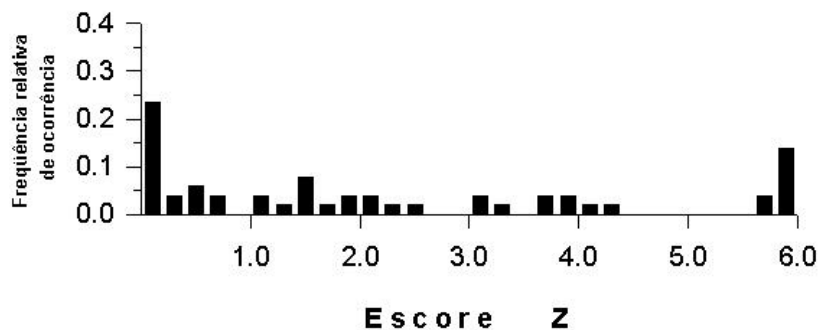


FIGURA 14. Assinatura de padrão histológico do grupo câncer

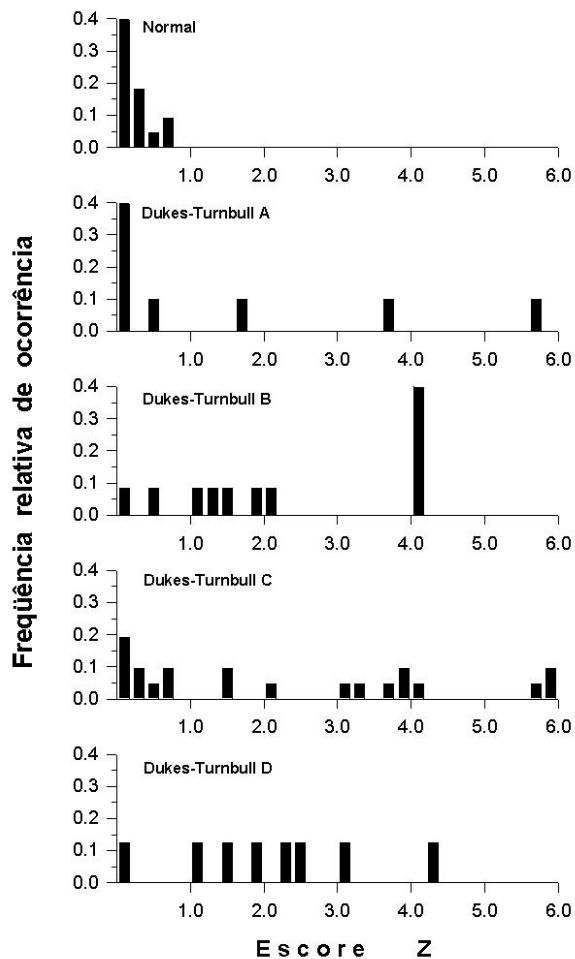


FIGURA 15. Assinaturas de padrão histológico do normal e dos estágios de Dukes-Turnbull

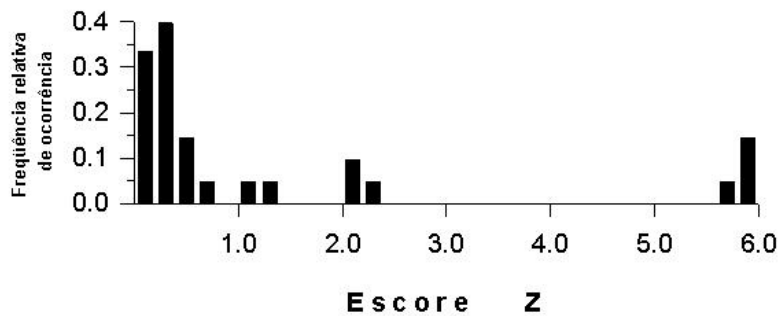


FIGURA 16. Assinatura de padrão histológico do subgrupo vivos sem doença

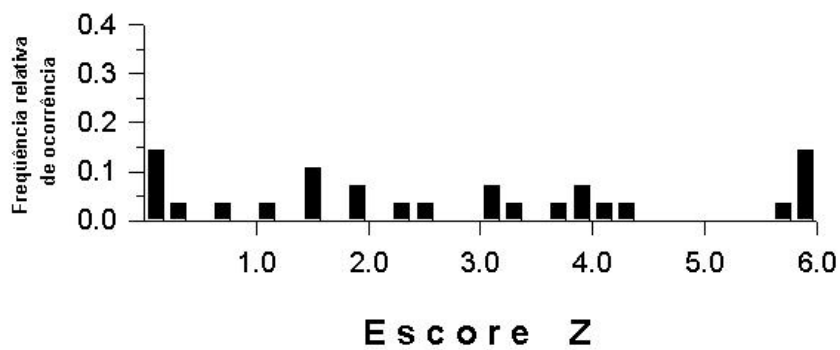


FIGURA 17. Assinatura de padrão histológico do subgrupo óbitos

As distribuições da Densidade Óptica Total e suas frequências relativas de ocorrência foram computadas nos 6.001 núcleos e os resultados são visualizados nos histogramas apresentados, conforme o afastamento do zero no eixo das abscissas, o que representa o grau de desvio da normalidade (representada pela linha $2N$). Este distanciamento no eixo x demonstra que há menor quantidade de núcleos euplóides nesta categoria, distanciando-se

do normal para o patológico, ou também representa uma maior variação dos núcleos de menor transparência para maior opacidade, à medida que se distribuem neste eixo.

A Figura 18 apresenta o histograma da distribuição da DOT nos 3.635 núcleos da categoria diagnóstica do grupo câncer e a figura 19 mostra o histograma da distribuição da DOT nas demais categorias; dos 2.366 núcleos do grupo normal, dos 710 núcleos do subgrupo A, dos 892 núcleos do subgrupo B, dos 1.505 núcleos do subgrupo C e dos 528 núcleos do subgrupo D do estadiamento.

A Figura 18 demonstra que os pixels de Densidade Óptica concentram-se na faixa 50 a 150, distanciando-se bastante do zero e da linha 2N dos núcleos euplóides. Na figura 19 vê-se que o mesmo ocorre quando se estratifica por estágios de Dukes-Turnbull, e todos estes diferem da distribuição normal, onde a concentração se restringe à faixa do 0 a 50.

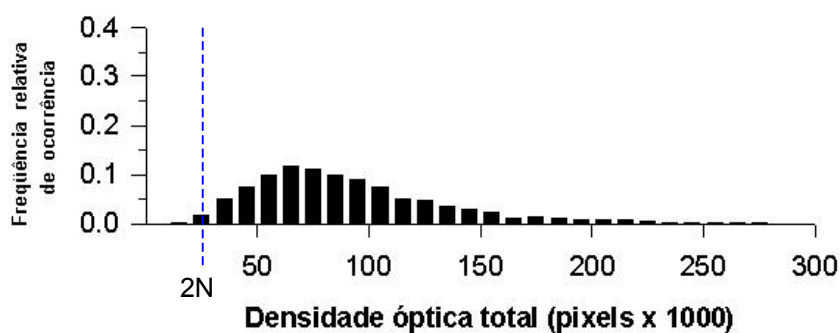


FIGURA 18. Histograma da distribuição da Densidade Óptica Total no grupo câncer (n= 3.635 núcleos). A linha tracejada indica a população euplóide (2N).

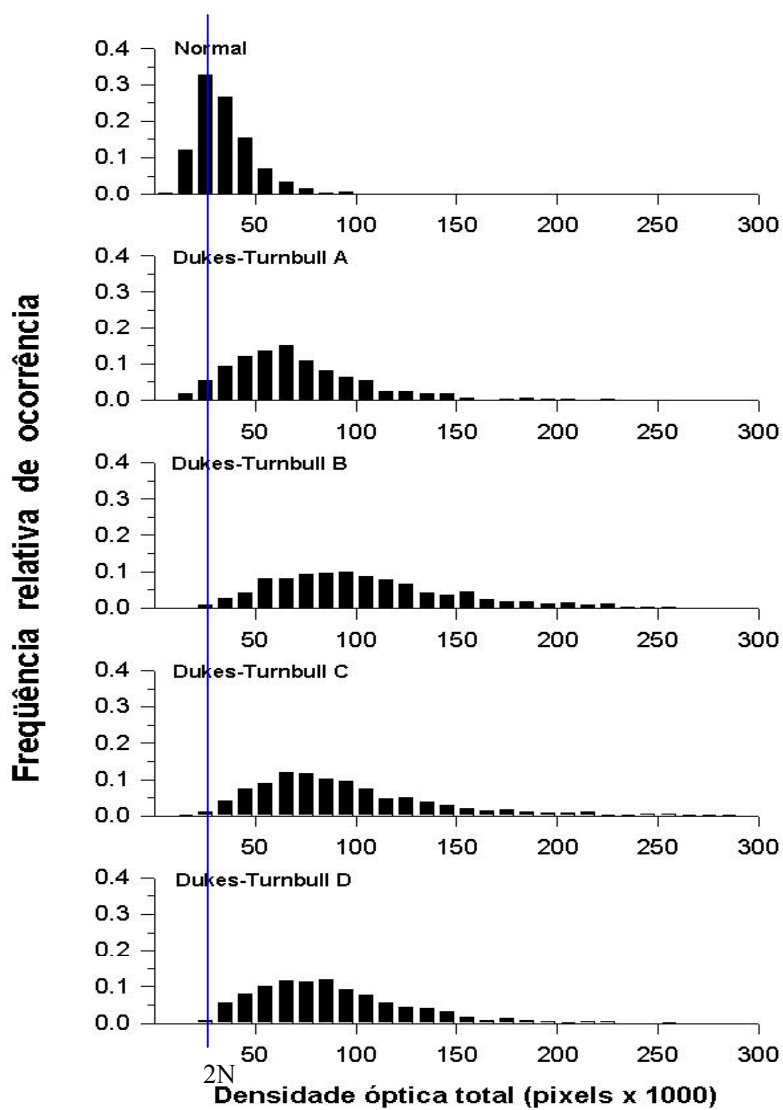


FIGURA 19. Histograma da distribuição da Densidade Óptica Total no grupo normal e nos estágios de Duker-Turnbull. A linha tracejada indica a população euplóide (2N)

Foi também verificado o potencial poder prognóstico das variáveis deste estudo, de interesse quanto ao óbito determinado pela doença, no período de seguimento completo de 5 anos.

Na análise bivariada foram testadas nove características clínico-patológicas: idade, sexo, grau de diferenciação histológica do tumor, produção de muco, linfonodos positivos, extensão de penetração do tumor na parede retal, estadiamento, dosagem de CEA pré-operatória e cirurgias curativas. Também foram incluídas as 11 características nucleares e a assinatura média nuclear. Todas testadas separadamente em relação à ocorrência de óbito como desfecho. As variáveis idade e CEA não apresentaram influência sobre a ocorrência do óbito. Como também, as variáveis categóricas sexo, grau de diferenciação histológica e produção de muco.

As características que se enquadram no modelo de Dukes, o próprio estadiamento e a variável cirurgia curativa se mostraram com poder de influência quanto à ocorrência de óbito, à análise bivariada ($P < 0,05$). O estadiamento demonstrou risco para óbito, com significância estatística crescente nos estágios A, B, C e D, sendo nos estágio C uma associação forte e no D muito forte. Das características cariométricas e assinatura média nuclear à análise bivariada: a Área, a Granularidade, e a assinatura média nuclear foram as que mostraram resultados mais significativos, separadamente, em relação à ocorrência de óbito ($P < 0,05$).

Para o modelo multivariado de Cox, tendo o óbito como desfecho, foram testadas as variáveis do estadiamento com as características cariométricas nucleares e a assinatura média e as variáveis clínico-patológicas de interesse biológico, para identificar aquelas que poderiam adicionar ao estadiamento, informações quanto ao prognóstico, ou o seu efeito independente como fator prognóstico sobre a ocorrência de óbito, como apresentado nas Tabelas 12 e 13. O estadiamento de Dukes-Turnbull foi a variável que apresentou a mais forte e clara associação com a ocorrência de óbito, sendo que todas as outras variáveis

testadas simultaneamente no modelo multivariado, ou seja, na presença da variável Dukes não apresentaram associações relevantes com o óbito.

Como apresentado na Tabela 12 as variáveis grau de diferenciação histológica, produção de muco, sexo e idade não apresentaram associações importantes com o desfecho, enquanto a classificação de Dukes-Turnbull apresentou uma forte associação com o óbito.

TABELA 12. Modelo de Cox: risco de óbito segundo variáveis de interesse

Variável	RR	IC 90%	P
Dukes-Turnbull			
A*	1,00	–	–
B	2,52	0,58 – 10,88	0,300
C	5,36	1,37 – 20,81	0,042
D	30,93	6,78 – 141,03	<0,001
Diferenciação Histológica			
Bem diferenciado*	1,00	–	–
Moderadamente Diferenciado	1,15	0,30 – 4,43	0,869
Pouco diferenciado	2,24	0,39 – 12,74	0,446
Mucoprodutor	0,53	0,16 – 1,70	0,367
Sexo Masculino	0,57	0,29 – 1,11	0,165
Idade, anos	0,99	0,96 – 1,02	0,83

* categorias de referência

Sendo a classificação de Dukes-Turnbull a variável que demonstrou maior poder de associação prognóstica para o óbito na análise bivariada e no modelo multivariado de Cox

com as variáveis de interesse, este estadiamento foi utilizado para testar as variáveis de características nucleares e assinatura média nuclear. Cada característica foi então testada separadamente para o óbito, contra o efeito do estadiamento, como mostra a Tabela 13.

Ao considerar-se então, o efeito das 11 variáveis de assinatura nuclear utilizadas e da assinatura média nuclear contra o estadiamento, tendo como desfecho o óbito, destacaram-se em ordem decrescente de influência as três características: DOT, a Granularidade nuclear além da assinatura média nuclear, com os valores de significância atingidos em modelo multivariado de Cox. Além da classificação de Dukes-Turnbull, a DOT, a Granularidade e a assinatura média demonstraram valor independente como preditores de mortalidade, sendo que a DOT foi a que apresentou melhor associação ($p=0,012$). Pacientes no mesmo estágio tumoral e com DOT diferentes tendem a apresentar mortalidades diferentes.

TABELA 13. Modelo de Cox com variáveis da assinatura nuclear

Variável	RR	IC 90%	P
Área	1,02	0,947 – 1,107	0,620
Aspecto	0,795	0,553 – 1,144	0,301
Densidade Média	1,102	0,960 – 1,264	0,244
Circularidade	0,796	0,546 – 1,162	0,322
DOT	1,105	1,037 – 1,180	0,012
Dimensão Fractal	1,064	0,810 – 1,396	0,709
Densidade Mínima	1,082	0,944 – 1,241	0,343
Densidade Máxima	1,148	1,005 – 1,311	0,088
Condensação	0,995	0,965 – 1,027	0,788
Heterogeneidade	1,050	0,992 – 1,111	0,159
Granularidade	1,021	1,005 – 1,037	0,029
Assinatura média	1,187	1,054 – 1,337	0,018

*** P ajustado após o efeito de Dukes-Turnbull, no cruzamento de cada característica com o estadiamento e Óbito**

6.0 DISCUSSÃO

O diagnóstico e o tratamento do câncer do reto evoluíram muito nos últimos anos. Exames sofisticados, principalmente endoscópicos de rastreamento da doença ou seguimento na vigilância de possíveis focos de recidiva, estão disponíveis pela utilização de imagens como a ultrassonografia, a tomografia computadorizada, a cintilografia, a ressonância magnética, dentre outros.

O entendimento cada vez maior da etiologia do CCR e das mutações dos genes envolvidos trouxe a possibilidade da investigação genética em alguns casos, como na polipose adenomatosa familiar (FAP) e no câncer não polipóide colorretal humano (HNPCC)¹⁴⁹.

A técnica cirúrgica, com o melhor entendimento da drenagem linfática e disseminação proximal, lateral e distal do tumor^{37,70,72}, permite hoje uma ressecção tumoral preservando a qualidade de vida para muitos dos pacientes. Realiza-se menos colostomias definitivas e cada vez mais as cirurgias conservadoras de esfíncter, também, pela possibilidade do uso de grampeadores mecânicos para a realização de anastomoses retais baixas^{73,150}.

A quimioterapia chegou a uma padronização mais apropriada com o uso de drogas menos tóxicas e da sua utilização em casos específicos, diminuindo em muito as complicações que ocorriam no passado. Da mesma forma, o tratamento radioterápico foi aperfeiçoado contando aparelhagem mais moderna, com feixes de raios direcionados, também com diminuição das complicações.

Ambas as modalidades de tratamento têm auxiliado a conter a recidiva local ou sistêmica da doença como tratamento complementar à cirurgia^{34,38}. A seleção adequada dos pacientes

para estes tratamentos é fundamental para o sucesso da abordagem terapêutica do câncer de reto.

Pelo exposto acima, era de se esperar que o CCR estivesse sob um controle mais adequado e que a sobrevida alcançasse índices mais satisfatórios. Porém, o câncer de reto é muito complexo, multifatorial e de várias interações mutagênicas influenciadas por fatores ambientais²⁵. A incidência mundial tem aumentado⁴. A localização no reto tem diminuído, com as proporções anteriores dentre os tumores colorretais em torno de 50%, para a faixa atual de 39%⁸. O motivo da distribuição mais proximal do CCR ainda não está bem esclarecido, sendo talvez atribuído ao número cada vez maior de endoscopias com remoções de adenomas pré-malignos, quebrando a sequência de surgimento deste tipo de câncer¹⁰. No entanto, alguns autores preconizam diferenças de mecanismos patogênicos para os tumores proximais^{13,14}.

A sobrevida no câncer de reto permanece estável, com índices médios variáveis entre 40% e 60% em 5 anos, apesar de todo o progresso disponível. Atualmente, indica-se tratamento complementar adjuvante no câncer de reto quando o tumor tem penetração até a gordura perirretal ou compromete linfonodos regionais^{34,38}. Portanto, as indicações são baseadas unicamente nos parâmetros patológicos propostos em 1929 e em 1932, por Dukes²⁷. Ainda hoje, este é o estadiamento mais utilizado⁵³, ou com suas modificações²⁸⁻³⁰. A própria classificação do sistema TNM²⁶ se baseia, essencialmente, nas variáveis propostas por Dukes e foi projetada para corresponder aos seus estágios. Esta é a conclusão do trabalho de revisão para aplicação clínica sobre múltiplos fatores de prognóstico realizado por Ratto e colaboradores⁵², como também a conclusão de Wiggers e colaboradores⁸⁰. Com utilização de análise multivariada, Kraemer e colaboradores⁶⁹ concluíram que as variáveis de Dukes têm valor independente no prognóstico do CCR, mas

citam que o grau de diferenciação histológica e a fixação do tumor podem ser fatores adversos adicionais para o câncer de reto. Este estudo das variáveis clínico-patológicas analisadas através do modelo de regressão multivariada mostrou que os parâmetros significativos e independentes para o câncer de reto foram: estadiamento de Dukes-Turnbull²⁸, metástases linfonodais, extensão de penetração do tumor na parede retal ou tecidos perirretais, variáveis estas que já fazem parte do próprio estadiamento de Dukes²⁷. A sobrevida decai drasticamente quando há comprometimento linfonodal ou distante, metastático da doença.

Dukes e Bussey¹⁵¹ obtiveram índices de 32% de SV em 5 anos em casos com linfonodos positivos, semelhante com os 33,3% alcançados neste estudo. O número de linfonodos removidos na peça cirúrgica é importante na cirurgia oncológica. No estudo de Hermanz de La Fuente e colaboradores¹⁵², estes autores concluíram que o número mínimo deveria ser de seis linfonodos removidos por caso para um adequado estadiamento e categorizar o estágio C corretamente. Neste estudo o número de linfonodos removidos por caso foi em média 15,86 ($\pm 9,89$), o que pode ser considerado satisfatório, demonstrando uma ressecção ampla da área de drenagem linfática do tumor e fornecendo segurança quanto ao estadiamento correto.

O resultado da análise multivariada no modelo de Cox mostrou que, dentre as variáveis clínico-patológicas verificadas, os estágios A, B, C e D foram os mais precisos em prognosticar o óbito, em ordem crescente de intensidade. Como se constata, estes fatores de prognóstico, ainda hoje, são considerados os mais consistentes e objetivos¹⁵³.

Nos últimos anos, inúmeras pesquisas têm sido realizadas na tentativa de descobrir novos parâmetros que possam auxiliar a prognosticar melhor o câncer de reto. Porém, estão ainda sem conclusões bem estabelecidas para a sua utilização na prática clínica. Trabalhos com

esta finalidade foram desenvolvidos com a proteína p 53 e bcl 2¹⁵⁴, infiltrado inflamatório peri-tumoral¹⁵⁵, necrose peri-tumoral⁶¹, citometria de fluxo e digital^{42,87,89}, dentre outros¹⁵⁶.

A análise de imagem digital, principalmente a partir dos anos 90, tem sido utilizada com o objetivo de auxiliar e melhorar os meios diagnósticos disponíveis, em vários órgãos. Como visto a sua utilização nos exames citopatológicos de escarro no diagnóstico do câncer de pulmão¹⁵⁷, em biópsias de fígado para seguimento da hemocromatose¹⁵⁸ e na diferenciação de linfomas não Hodgkin¹⁵⁹.

A assinatura digital das características da textura da cromatina nuclear, por análise de imagem, é um novo método que tem se mostrado de utilidade no diagnóstico e como prognóstico de determinados tumores. Foi desenvolvido na Universidade do Arizona, USA, com participação exponencial do Dr. Peter H. Bartels e difundido para outros centros do mundo. No nosso caso, pela iniciativa do Dr. João Carlos Prolla e seu grupo, este método tornou-se exequível no HCPA, destacando-se o Dr. Vinícius Duval da Silva com os primeiros estudos em próstata.

Dentre as publicações do Dr. Bartels destacam-se às referentes ao tecido prostático, já com a metodologia de utilização da coloração em HE, que é de uso mais fácil e disponível, com boa qualidade e econômica, contornada com o uso de filtros de interferência para melhorar o contraste dos esfregaços e devido as dificuldades técnicas no manuseio da coloração de Feulgen, que aumenta os custos. Do material proveniente de prostatectomias, foram avaliados 1.443 núcleos de regiões normais, de displasia intraepitelial de baixo e alto grau e de câncer, em reduzido número de casos, concluindo que o método serviu para o diagnóstico e monitoramento de tratamento com intenção quimiopreventiva¹¹³. Mostrou também, nestes mesmos pacientes, que as alterações da cromatina são precoces em núcleos de tecidos aparentemente normais, na neoplasia intraepitelial e no adenocarcinoma de

próstata¹¹⁴ e que as assinaturas de núcleos individuais são distintas, mostrando alterações subvisuais em ocasiões em que o AP foi considerado normal. Desta forma, foi sugerida a possibilidade do uso da assinatura digital com utilidade prognóstica, também do estudo nestes mesmos núcleos, utilizando 65 características de textura da cromatina nuclear⁴⁸. Mas nestes pacientes estudados não há nenhuma referência de controle ou seguimento, ambos se restringiram a espécimes de cinco prostatectomias por benignidade, 11 neoplasias intraepiteliais de baixo e sete de alto grau e três por carcinoma. Também em relação à próstata, Bostwick¹⁶⁰ concluiu que marcadores morfométricos, dentre eles a textura da cromatina nuclear refletem alterações quantitativas de DNA e podem ser úteis na construção de modelos para estimativas de prognóstico, porém não há relato de seguimento dos pacientes para corroborar esta afirmativa.

Um estudo, em 46 espécimes de câncer de colo uterino, de caracteres da morfometria nuclear, textura da cromatina e arquitetura histológica, com finalidade de prever a sobrevida em 3 anos, concluiu que o método pode ter valor prognóstico no câncer cervical uterino¹⁶¹. Nas glândulas adrenais um estudo de 10 adenomas e cinco adenocarcinomas, com 50 núcleos de cada caso, mostrou diferenças das texturas da cromatina entre os dois grupos¹⁶².

Distinção também foi observada no estudo de 2.100 núcleos de 27 casos de mesotelioma epitelial e 15 casos de adenocarcinoma de pulmão, que diferiu em 80% dos casos das categorias diagnósticas, em sete características nucleares verificadas¹⁶³. Na ampola de Vater o estudo de 38 características nucleares em 48 espécimes diferenciou, por análise de imagem digital, a displasia da neoplasia¹⁶⁴. Na mama, a progressão de alterações nucleares do baixo grau para alto grau e carcinoma ductal, foi mostrada na sequência de suas assinaturas digitais nucleares desviando-se do normal, e foram analisadas em seis casos

normais, 13 de displasias, e 20 com câncer, totalizando 1.900 núcleos estudados e verificadas as 93 características do Sistema TICAS¹⁶⁵.

O endométrio foi estudado por Garcia e colaboradores¹²⁰ e Bartesl e colaboradores¹⁶⁶, este último estudo com seis casos de categorias diagnósticas distintas com 60 núcleos de cada uma; normal, endométrio proliferativo, secretor, hiperplasia, atipia e adenocarcinoma.

Todos os estudos apresentam um número reduzido de pacientes e de núcleos. Os autores Da Silva e colaboradores concluíram em três trabalhos: a) que o uso da imagem digital tem valor diagnóstico para células malignas em derrames serosos¹⁶⁷, trabalho desenvolvido no HCPA b) também no HCPA, que o uso da assinatura digital nuclear e de lesão, no esôfago de Barrett, de 900 núcleos verificados, sugeriu que a metaplasia é mais próxima do adenocarcinoma esofágico que o esperado¹¹⁹ c) que as assinaturas nucleares, de lesões e a distribuição da DOT das oito características verificadas, caracterizaram a neoplasia intraepitelial de alto grau e o câncer de próstata⁴⁷.

No intestino grosso a literatura se restringe a poucos relatos do uso da análise de imagem digital. Fernândes-Lópes e colaboradores⁹⁰ tentam mostrar o valor prognóstico da morfometria nuclear no CCR, verificando somente o diâmetro, perímetro e a área em 90 pacientes submetidos à cirurgia, classificados conforme Dukes em sete casos A, 36 B, 36 C e 11 D e com seguimento de 18 a 60 meses. Constataram que a sobrevida foi significativamente menor nos pacientes com núcleos maiores e concluíram que o tamanho e a forma nuclear auxiliam a predizer a sobrevida, podendo se associar ao estadiamento de Dukes para isso. Outro estudo do peso médio e volume nuclear em 4.200 núcleos de adenocarcinoma de cólon¹⁶⁸, relacionando-os com a sobrevida, em 42 pacientes com seguimento de 89 meses, conclui que não houve informação adicional ao curso clínico.

Estes trabalhos se restringem às características de medidas nucleares e não analisaram outras alterações, tais como a textura da cromatina nuclear. Montag e colaboradores¹⁶⁹, com a análise de seis caracteres nucleares próximo ao tumor de cólon e no próprio tumor, em sete adenocarcinomas de descendente, um de transverso e um de ascendente, com 1.620 núcleos de adenocarcinomas e 1.620 normais, ressaltam que a área nuclear e a DOT são os melhores discriminantes entre o controle normal, o adenocarcinoma de cólon e as regiões próximas ao tumor, e que no tumor, a distribuição da DOT mostra padrão aneuplóide, usando o Sistema TICAS. Trata-se de um estudo inicial com um pequeno número de casos. Estes mesmos autores¹⁷⁰, com os mesmos nove pacientes anteriores com adenocarcinomas de cólon e nove controles normais, biopsiaram regiões próximas 2, 5, 10 e 50 mm da mucosa aparentemente normal e com a análise de oito características morfométricas, acharam diferenças estatisticamente significativas, concluindo que o tecido normal difere do câncer e que os tecidos das regiões verificadas próximas ao tumor diferem também do normal. O estudo baseou-se também em um número pequeno de casos e de núcleos.

Como apresentado acima, não há registro na literatura até o momento e que seja do nosso conhecimento de um estudo das características cariométricas e da textura da cromatina nuclear específico para o adenocarcinoma de reto, mormente com o número de núcleos estudados e com um seguimento mínimo de 5 anos dos pacientes operados, para uma melhor verificação prognóstica. Foi um estudo pioneiro que objetivou a verificação de quais características nucleares que estariam envolvidas ou não, para possibilitar a caracterização do adenocarcinoma de reto, o que foi alcançado com o método proposto. Não foi nossa preocupação aferir o seu potencial diagnóstico através da sensibilidade, especificidade e valores preditivos, visto que o diagnóstico foi estabelecido pelo exame anátomo patológico convencional. A aferição diagnóstica do método utilizado seria

empírica, pois se tratando de uma nova proposta, ainda não existem valores de referência estabelecidos, admitidos como padrões de desvios da normalidade, a partir de quando o exame seria considerado positivo ou negativo. Assim a comparação se restringiu a mostrar as diferenças da normalidade e também tentar demonstrar, com auxílio de avaliações comparativas estatísticas, as influências das variáveis do estudo em relação ao desfecho, visto que se dispunha do seguimento completo dos pacientes.

Como mencionado anteriormente, nos últimos 50 anos, as decisões terapêuticas foram alicerçadas nos dados fornecidos pelo exame AP, microscópico, pós-operatório, de tecidos ressecados. No entanto, este método não contempla o dinâmico processo biológico envolvido no desenvolvimento do câncer e na sua disseminação metastática. Os exames de imagem colaboram para o estadiamento clínico, mas são imprecisos para lesões muito pequenas. O cirurgião durante o trans-operatório é obrigado a tomar decisões baseadas na sua experiência de palpação e visão macroscópica de possíveis alterações, para delimitar a extensão das ressecções cirúrgicas. A evolução chegou também, em poucos centros disponíveis, com utilização da cirurgia radioimunoguiada¹⁷¹ (RIGS; Neoprobe Corporation, Dublin, OH), onde a injeção de anticorpos monoclonais radioligados (MABS) é detectado por manuseio de um detector de radiação gama pelo cirurgião no trans-operatório em tecidos impregnados. Este método utilizado em 59 pacientes auxiliou em muito no diagnóstico de metástases ocultas.

Identificar corretamente os pacientes que necessitam de tratamentos complementares adjuvantes ao tratamento cirúrgico é fundamental para os pacientes com câncer de reto.

No estudo em discussão, todas as cirurgias foram eletivas, abstraindo-se os casos de obstrução ou perfuração. A equipe cirúrgica, o preparo, o estadiamento, o seguimento e o tratamento complementar seguiram unicamente a rotina de atendimento do Serviço de

Coloproctologia do HCPA, descrita anteriormente. A uniformização do atendimento é importante na obtenção dos resultados, visto que diferenças importantes de técnicas empregadas podem alterar o prognóstico dos casos^{76,77}. Todos os exames anátomo-patológicos foram também realizados num único local, o Serviço de Patologia do HCPA. Fator importante para um correto estadiamento, com uniforme interpretação das variáveis patológicas. O estadiamento incorreto pode interferir na decisão de terapia complementar ao tratamento cirúrgico.

No estudo, as variáveis clinico-patológicas: idade, sexo, grau de diferenciação celular do tumor e a dosagem do CEA não se mostraram com significância estatística, no cruzamento com o estadiamento de Dukes-Turnbull, tendo o óbito como desfecho. Somente as variáveis já presentes neste estadiamento se mostraram significantes. Por ser um método prognóstico simples, poderoso, e consistente, o estadiamento de Dukes²⁷ ainda hoje é utilizado para o câncer de reto.

Outros fatores patológicos, como a invasão venosa ou neural na peça cirúrgica, somente foram encontrados em um número reduzido de casos, motivo pelo qual não puderam ser avaliados. O limite radial comprometido pela doença foi encontrado em sete (13,7%) casos, demonstrando as dificuldades das ressecções dos tumores retais, confinados nas estruturas pélvicas, muitas vezes infiltrativos às estruturas adjacentes em casos avançados. Três destes pacientes já apresentavam metástases hepáticas no momento da cirurgia, outro já apresentava comprometimento linfonodal e os três restantes, invasão dos tecidos perirretais.

O tratamento complementar adjuvante só foi estabelecido com maior padronização a partir da década de 1990, com os estudos de Moertel e colaboradores¹⁷². As dificuldades em se conseguir tratamentos complementares através dos órgãos gestores de Saúde na ocasião das cirurgias realizadas (1988 a 1996), com poucos estabelecimentos disponíveis para as

suas realizações, encaminhamentos complicados, podem ter contribuído para que um número reduzido de pacientes conseguisse realizar a terapia. Outro fato importante foi de que a radioterapia à época estava dissociada da quimioterapia. Os casos mais recentes do estudo oportunizaram-se melhor destes tratamentos que foram realizados com caráter adjuvante no pós-operatório em 10 (34,4%) dos 29 pacientes que se submeteram às cirurgias curativas, excluídos os 10 casos Dukes A. Alguns casos da não realização destes tratamentos ocorreram por recusa ou interrupção pelo próprio paciente. Estas dificuldades ocorrem também em outros centros, como constatado no estudo realizado por Hermanek⁷⁶, em 1999, onde somente 13,5% dos pacientes receberam tratamento adjuvante.

O índice de sobrevida alcançado, em 5 anos de seguimento, foi de 45,1%. Este índice está de acordo com os encontrados na literatura¹⁰ e com levantamentos anteriores neste mesmo hospital^{58,59}.

A recidiva local que ocorreu em 12,8% dos casos, também está de acordo com as encontradas na literatura¹², variável de 10% a 28%, levando-se em conta as dificuldades para as realizações de tratamentos complementares. No levantamento realizado de 1973 a 1992 em pacientes submetidos à amputação abdominoperineal de reto^{58,59} verificou-se recidiva locorregional em 22,5% dos pacientes, mostrando que há uma tendência para a sua redução nestes últimos anos.

Os 28 óbitos ocorridos pela doença seguiram as proporções crescentes nos subgrupos dos estágios de Dukes-Turnbull²⁸, sendo dois óbitos (20%) em 10 no A, quatro (33,3%) de 12 casos no B, 14 (66,6%) de 21 casos no C e oito (100%) casos de oito no D. Estes resultados mostram o forte poder da classificação clínico-patológica de Dukes-Turnbull em prognosticar o desfecho da doença. Resultados semelhantes ocorreram quando se verificou a origem dos 17 pacientes que faleceram em decorrência da doença nos 5 anos de

seguimento, dentre os 39 pacientes que tinham sido submetidos a cirurgias curativas e que foram relacionados aos estágios de Dukes²⁷ : dois (20%) de óbitos em 10 casos A; dois (22,2%) em nove casos B e 13 (65%) em 20 casos C.

Quanto aos outros resultados mais significativos obtidos com este estudo, em relação às características nucleares, eles nos mostraram que as assinaturas mais marcantes que caracterizaram o adenocarcinoma de reto, foram: das características verificadas na assinatura nuclear, na assinatura de padrão histológico, na assinatura média nuclear e na distribuição da DOT, resultados não comparáveis com a literatura por não estarem disponibilizados.

Quanto ao prognóstico, os trabalhos publicados utilizando a assinatura nuclear digital em outros tecidos, não dispunham de seguimento dos pacientes ou apresentavam número reduzido de casos e núcleos, mormente na área de abrangência do cólon. A este respeito nossos resultados, ainda que composto por uma amostra de 6.0001 núcleos e 73 casos, sendo 51 de adenocarcinomas de reto, com seguimento mínimo de 5 anos, apresentam informações relevantes e que poderão ser confirmadas em novos estudos, como: uma dentre as 11 características analisadas mostrou maior poder prognóstico independente do proposto pela classificação de Dukes-Turnbull. Isto significa que pacientes no mesmo estágio de Dukes e com resultados diferentes da DOT podem ter um curso diferente daquele esperado, e daquele que atualmente mais se utiliza como preditor da sobrevida. Nestas situações, a assinatura digital poderá ter importância para a indicação de tratamentos adjuvantes complementares ao cirúrgico em pacientes que hoje não seriam candidatos a este tipo de tratamento. Esta pode ser uma das várias explicações possíveis de ocorrência de metástases ou recidivas não, ou pouco esperadas, no estágio A. Desta maneira, pacientes com fator de

risco aumentado para o óbito à assinatura digital, (a DOT), poderiam ser incluídos nos esquemas de tratamentos complementares, que hoje não os contemplam.

Também chama a atenção nos resultados o valor encontrado para a assinatura nuclear média no Dukes B, a qual alcançou valores mais elevados, distanciando-se mais do normal. Esperaríamos, por analogia dos estadiamentos, que isto ocorresse no estágio D. Este maior distanciamento do normal, nos Dukes B, nos faça refletir para a potencial necessidade de um tratamento mais agressivo complementar, também nestes pacientes.

Este achado relevante nos levou a identificar os 12 pacientes do subgrupo B para avaliação das médias dos valores de seus núcleos em relação às 11 características nucleares e foi verificado que não se tratava de um caso isolado discrepante, e sim de valores médios de todo o conjunto dos casos deste subgrupo.

Foram verificados, também, os valores nucleares dos dois casos deste subgrupo que faleceram e que tinham sido submetidos à cirurgia curativa. Nestes pacientes foram encontrados valores elevados da granularidade nuclear e da DOT que foram as características que mais se destacaram nos histogramas das assinaturas nucleares. A DOT nestes dois pacientes ficou ranqueada em um caso como a segunda e no outro caso como a 18º posição de valores mais elevados na comparação com os 73 casos verificados, incluídos os normais. A Granularidade nuclear nestes mesmos dois casos ficou ranqueada em 3º e 5º posição de valores mais elevados dentre os 73 casos verificados. Ainda em relação a estes dois pacientes do subgrupo B, que foram ao óbito pela doença, verificou-se que ambos faleceram de metástases à distância, sem recidiva locorregional e não receberam tratamento complementar rádio-quimioterápico pós-operatório. A importância de valores muito elevados da DOT poderia ser um indicativo de prognóstico adverso, como concluído posteriormente com a análise estatística dos resultados. Os tratamentos complementares,

observados e julgados a posteriori dos fatos, realmente beneficiariam a estes pacientes. Ambos os casos eram moderadamente diferenciados, não eram mucoprodutores e um tinha extensão de penetração do tumor até a adventícia, com localização aos 3 cm da margem anal e o outro com invasão da gordura perirretal e situado aos 8 cm da margem anal.

Foi possível caracterizar o adenocarcinoma de reto e as 11 médias das características analisadas se mostraram com diferenças daquelas verificadas no grupo de tecido normal. Os resultados obtidos neste grupo normal, com assinaturas médias e valores de suas características em valores arbitrários de zero ou próximos deste valor, como seria o esperado, demonstra que esta amostra serviu perfeitamente como valor de referência, como controle para a amostra do grupo adenocarcinoma, sendo, portanto, uma população celular homogênea.

Todos os histogramas apresentados caracterizando o adenocarcinoma de reto em suas assinaturas nucleares e de padrão histológico, com suas características mais marcantes, desviaram-se dos normais. As características que mais se destacaram foram a Área e a DOT, o que se assemelha aos achados de Montag e colaboradores em relação ao adenocarcinoma de cólon¹⁶⁹. As características que diferiram sobremaneira em todos os estágios em relação ao tecido normal foram, a Área, DOT, a Densidade Mínima, a Densidade Máxima e a Dimensão Fractal.

Outro resultado que merece comentário é que algumas características do grupo normal e subgrupos óbitos e vivos sem doença em 5 anos diferiram entre si, na comparação das médias, porém o grupo normal é semelhante ao subgrupo dos vivos sem doença e diferiu do subgrupo dos óbitos, mas estes não diferiram entre si. Esta diferença da normalidade maior no subgrupo de óbitos pode talvez explicar o desfecho mais desfavorável nestes pacientes.

As assinaturas de padrão histológico ou de lesão mostraram um distanciamento do normal no grupo dos adenocarcinomas e em todos os subgrupos do estadiamento. Os histogramas das assinaturas de lesão dos subgrupos dos estágios de Dukes-Turnbull demonstraram as alterações proporcionais de afastamento da normalidade correspondente e proporcional ao estágio, assim como verificado que as diferenças maiores em relação ao normal ocorreram no subgrupo óbitos em relação aos vivos sem doença, em 5 anos. Destes 17 pacientes que faleceram, dentre os 39 que foram submetidos à cirurgias curativas: dois de 10 eram Dukes A e um teve recidiva locorregional e o outro distante; dois de 12 eram Dukes B e os dois tiveram recidivas distante; e 13 de 20 eram Dukes C e três tiveram recidivas locorregional e 10 distante. Destes 17 pacientes, 11 (64,70%) não receberam tratamento complementar, o que pode ter contribuído para as recidivas e óbitos. Ainda deste subgrupo de 17 pacientes, quatro (23,5%) fizeram radioterapia e tiveram recidiva distante; um (5,8%) fez só quimioterapia e teve recidiva distante; e um (5,8%) fez rádio-quimioterapia e veio a falecer de recidiva distante. Excluídos os dois casos Dukes A, neste subgrupo seis (40,0%) pacientes receberam tratamento complementar pós-operatório.

A distribuição da Densidade Óptica Total nos seus histogramas representativos demonstra uma clara diferença do grupo normal, com uma concentração acentuada próximo ao eixo y, diferentemente do grupo adenocarcinoma e também dos subgrupos dos estágios de Dukes-Turnbull, nestes com distribuição dos pixels de densidade óptica afastando-se do normal em suas frequências relativas de ocorrência. Estes achados mostram que a população de núcleos normais estudados tem menor opacidade da cromatina, podendo traduzir um maior grau de euploidia do seu DNA, diferente dos adenocarcinomas.

A DOT na análise multivariada do modelo de Cox, apresentou melhor associação de influência independente sobre a ocorrência do óbito. Desta maneira, esta pareceu a

característica mais destacada neste estudo, logo seguida da Granularidade e da assinatura média nuclear.

7.0 CONCLUSÕES

1. O estudo das 11 características cariométricas verificadas por análise de imagem digital permitiu a caracterização dos núcleos celulares no adenocarcinoma primário de reto.

2. A caracterização dos núcleos celulares no adenocarcinoma primário de reto permitiu a obtenção de assinaturas digitais específicas para esta doença e estas diferiram das assinaturas do tecido normal de reto.

3. As características nucleares mais importantes para o adenocarcinoma primário de reto em suas assinaturas nucleares digitais, neste estudo, foram a DOT, a Área e Granularidade nuclear, com diferenças estatisticamente significativas do tecido de reto normal.

4. A assinatura média nuclear do estágio B de Dukes modificado por Turnbull diferiu com significância estatística da assinatura média nuclear do tecido de reto normal e das assinaturas médias nucleares dos outros estágios do adenocarcinoma primário de reto.

5. Além da classificação de Dukes modificada por Turnbull, dentre as características nucleares estudadas, a DOT foi a que se mostrou com melhor poder prognóstico em relação ao adenocarcinoma primário de reto.

8.0 PERSPECTIVAS

A ciência da informação, baseada em dados numéricos ou descritivos, tornou-se uma ferramenta adequada na exploração do processo diagnóstico em patologia, em velocidade elevada na era da tecnologia digital, podendo ser reproduzidas, o que permite sistemas capazes de decisões diagnósticas que podem ser interligadas a laboratórios variados¹¹⁵.

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. O consenso diagnóstico em patologia, mesmo entre observadores experimentados pode ser variável em determinadas situações¹⁷³.

Nos últimos anos, a ênfase no uso da quantificação tem se deslocado para a aplicação de métodos baseados na informação em formato não numéricos e tem sido utilizada para combinar evidências diagnósticas de maneira que a estrutura de dependência condicional permaneça intacta, o que permite a utilização de computadores¹⁷⁴.

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. As aplicações dessas novas tecnologias tornam mais evidentes os problemas de comunicação entre diferentes áreas. Os métodos disponíveis para análise de imagens microscópicas têm suas origens em áreas como a estatística, desenho experimental, morfologia matemática, álgebra, sistemas especialistas, gerenciamento de dados, manejo de incerteza, teoria de conjunto difusos e muitos outros. É uma abordagem multi-disciplinar com troca de informações entre diferentes especialistas, como no caso dos sistemas complexos.

Esta metodologia poderá num futuro próximo beneficiar, auxiliar e se somar aos métodos atualmente disponíveis na tomada de decisões pré ou pós-operatórias para uma melhor abordagem terapêutica e manejo clínico-oncológico dos pacientes portadores de adenocarcinoma primário de reto.

Quanto à assinatura digital, poderá em estudos futuros, permitir a análise exclusiva: dos casos Dukes B; dos resultados de materiais de biópsias versus tumores; e, também, a comparação do estudo somente das características que obtiveram melhor desempenho neste estudo, quanto a caracterização e em relação ao prognóstico do adenocarcinoma de reto versus as 11 características verificadas.

Como muito bem dito por Konrad Lorenz: “A verdade na ciência pode ser definida como a hipótese de trabalho melhor dotada para abrir caminho para a próxima melhor hipótese”.

ANEXO 01. MATERIAL DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Paciente C.K., feminina, de 51 anos, portadora de adenocarcinoma moderadamente diferenciado de reto médio, submetida à cirurgia no Serviço de Coloproctologia do HCPA em janeiro de 2002, cujo estadiamento foi o D de Dukes-Turnbull, com metástase hepática. Foram colhidos materiais dos tecidos, com pinças de biopsia, do tumor de reto médio e de reto normal inferior, distante 4 centímetros da margem macroscópica do tumor. Estes foram analisados para verificação diagnóstica e submetidos à preparação de lâminas de estudo para microscopia óptica e eletrônica, gerando as ilustrações obtidas nas Figuras 01 e 02 descritas no texto.

O estudo da eletromicrografia foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da ULBRA, e foi orientado e interpretado pelo Prof. Dr. José Rafael Rosito Coiro, utilizando a técnica de processamento descrito a seguir:

Na microscopia eletrônica de transmissão (MET), foram utilizados os fixadores glutaraldeído e tetróxido de ósmio em tampão¹⁷⁵.

A contrastação “em bloc” foi executada com acetato de uranila em solução aquosa a 1%¹⁷⁶.

A desidratação foi feita em série alcoólica, desde 25% até 100%.

Para embebição, utilizou-se o meio de inclusão Embeb 812. Os cortes ultrafinos de 100 nm foram obtidos em ultramicrotomo Ultratome UCT (LEICA). A contrastação final foi executada com citrato de chumbo¹⁷⁷.

Para a observação e documentação eletromicrográfica, foi utilizado o MET EM 208 S (Philips), com 70-80 kV.

ANEXO 02. ORIGEM DOS NÚCLEOS DOS CASOS ESTUDADOS

TABELA 14. Identificação dos casos e núcleos do grupo câncer e normal

Nº	Grupo câncer	Registro	Nº AP	DUKES/T	NÚCLEOS
1		4405296	91363	C	66
2		1751445	88035	A	71
3		4700100	101004	A	70
4		4883351	106994	C	70
5		5632021	133406	C	66
6		893222	95453	A	63
7		6074173	153621	C	74
8		5660246	134629	C	89
9		471276	84944	C	76
10		4793667	150357	B	93
11		333773	120933	A	74
12		5363296	120615	A	64
13		5277850	116663	C	65
14		4682647	100346	C	76
15		4194999	83671	B	82
16		4616843	96413	B	80
17		5711569	137166	C	75
18		5962014	149284	B	90
19		5643606	133923	A	61
20		6423305	170555	C	95
21		2004653	129612	C	63
22		4707261	151710	C	70
23		248047	143209	C	68
24		234559	92478	C	80
25		4428397	90601	C	65
26		2939601	170443	B	86
27		351064	112194	C	62
28		5648530	133976	B	68
29		5244991	115908	A	91
30		5845524	142860	C	63
31		7083423	200916	A	73
32		5390919	195315	C	66
33		6900302	192416	B	66
34		6495758	171837	C	65
35		4101036	79932	C	70
36		4980256	144790	B	67
37		5331962	120746	B	64
38		630087	184463	A	76
39		6062103	153546	A	67
40		6095848	154653	B	68
41		4382826	89451	D	73

42	1596154	160179	D	77
43	5376009	167975	D	56
44	6452239	171472	B	64
45	5665377	135684	B	64
46	6526487	173739	D	66
47	517203	112963	D	67
48	5833637	142746	C	81
49	4437067	162818	D	62
50	6257125	163140	D	67
51	5644638	135378	D	60

Nº	Grupo normal	REGISTRONº AP	NÚCLEOS
1	007794-1	236958	114
2	762401-8	273218	110
3	583803-2	262453	106
4	725214-1	209811	103
5	070718-2	221708	107
6	240626-2	245965	106
7	692336-1	224446	101
8	751336-9	224857	105
9	736061-3	216539	110
10	739963-7	219985	120
11	794280-8	266010	102
12	838988-4	274500	112
13	241157-7	274498	103
14	340039-7	230827	110
15	203426-2	213052	107
16	388208-1	272782	109
17	838162-6	270044	110
18	838245-9	273633	106
19	629887-1	274960	114
20	838557-7	274499	103
21	841970-7	275966	103
22	756406-5	275968	105

*Dukes/T = Estágio na classificação de Dukes modificada por Turnbull.

ANEXO 03. CARACTERÍSTICAS NUCLEARES DO SISTEMA TICAS

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) ou (IOD): é o somatório dos valores de pixels em linhas e colunas dentro da área nuclear. O denominador é um fator de correção para o Sistema TICAS.

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

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 a 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):

$$\text{Ext 2} = \sum_{\substack{I=0 \\ (i,j)}}^{m_x} \sum_{\substack{J=0 \\ \text{in } N}}^{m_y} I[i][j]^2$$

$$\text{Ext Sum} = \sum_{\substack{I=0 \\ (i,j)}}^{m_x} \sum_{\substack{J=0 \\ \text{in } N}}^{m_y} I[i][j]$$

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.

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

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

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

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

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

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

HE: a faixa atinge os 255 tons de cinza em 17 grupos de 15 elementos (bins: 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-ocorrencias) 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.	0-0.3	0.3-0.6	0.6-0.9	0.9-1.2	1.2-1.5	>1.5
0-0.3	1					
0.3-0.6		3	2			
0.6-0.9	1					
0.9-1.2						
1.2-1.5						
>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						
0.3-0.6	111					
0.6-0.9	1					
0.9-1.2	11	11				
1.2-1.5						
>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)

Consideramos $rlh [i] [j]$ 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. Os percentuais de seqüências (RP) são a razão entre o número total de seqüências e o número total de seqüências possíveis, o qual está relacionado à area total do núcleo. Valores baixos desse parâmetro estão relacionados a imagens com estruturas lineares.

Características 312 a 318

Característica 312: heterogeneidade de densidade óptica (het).

Característica 313: homogeneidade de densidade óptica (hom).

Característica 314: compactação (cl).

Característica 315: condensação (cond).

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

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

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

Características envolvendo densidade óptica:**Heterogeneidade:**

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

Onde:

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

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

Nt = total de pixels no núcleo.

Característica 312: heterogeneidade. HET = h1

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

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

Nt = como definido acima.

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

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

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

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

nw = número de pixels brancos no mesmo conjunto.

| | = valor absoluto

a seguir, o valor cl deve ser definido:

$$cl = \frac{tm}{\Sigma \text{ diff}}$$

$$i=1$$

onde:

tm = número total de conjuntos encontrados no núcleo.

Logo:

Característica 314: clumpness

$$cl = cl / nb + nw$$

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

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

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

* Todos os cálculos são realizados na imagem negativa.

Característica 315: condensação (condensation):

$$cond = cl / nt$$

O valor médio é definido como:

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

Logo:

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

(av20b):

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

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

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

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.

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

Característica 319 a 321:

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

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

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

O cálculo dessas características é feito pelo seguinte algoritmo:

Let th1 = av20b

 th2 = av20a

Begin

 Let nb = ng = nw = 0

 For all x = (i, j) in N

 {

 if (I [i] [j] < th1) nb = nb + 1

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

 }

Característica 400: Dimensão Fractal.

Frac Dim = log (número de pixels similares) / log (do fator de magnificação).

Característica *: Aspecto (Aspect).

Baseada no método de análise de Procrusto. Um termo utilizado para métodos baseados em cálculo de raiz quadrada para estimar parâmetros de dano (“nuisance”) em transformação de similaridade Euclidiana. O método baseia-se em rotação direta para testes de hipótese de fatores estruturais, Behav. Sci. 7: 258 – 262.

* Observação: esta característica não tem número correspondente no Sistema TICAS.

ANEXO 04. APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO GPPG-HCPA.



GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

As Comissões Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela CONEP como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, reanalisaram o projeto:

Número: 00.141

Título: "CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES E NÚCLEOS CELULARES NEOPLÁSICOS NO ADENOCARCINOMA DE RETO PELO MÉTODO DA ASSINATURA DIGITAL."

Autores: Luis Fernando Moreira, Vinicius Duval da Silva e Mário Antonello Rosito.

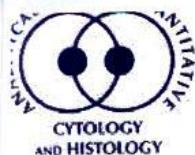
- O mesmo foi aprovado, por estar adequado ética e metodologicamente, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) e às Resoluções Normativas do GPPG/HCPA. **Os autores deverão encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do Projeto.**

Porto Alegre, 30 de junho de 2000.



Prof. Themis Reyerbel da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP/HCPA

ANEXO 05. RESPOSTAS DOS RECEBIMENTOS DOS ARTIGOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÕES.



Official Periodical of
International Academy of
Cytology and The American Society
of Cytopathology



Editors-in-Chief

George L. Wied, M.D., FIAC
and H. Bartels, Ph.D., FIAC(hon)

Editorial Office
Box 12425
42 Olive Boulevard
Louis, MO 63132-2814
U.S.A.
Tel: (314) 991-4588
Fax: (314) 991-4654
E-mail: editor@aqch.com
www.aqch.com

July 15, 2002

Mario A. Rosito, M.D., M.S.
Av. Gen. Barreto Viana, 265, Chacara das Pedras
91330-630 Porto Alegre, Rio Grande do Sul
Brazil

Dear Dr. Rosito:

Thank you for sending your manuscript, **NUCLEAR CHROMATIN TEXTURE IN RECTAL CANCER**. We will submit it to the editorial board for review and will inform you of the board's decision in the near future.

If you have questions about your manuscript, please E-mail them to editassist@aqch.com.

Your interest in *ANALYTICAL AND QUANTITATIVE CYTOLOGY AND HISTOLOGY* is greatly appreciated.

Sincerely,

George L. Wied, M.D.
Editor-in-Chief

GLW/pr

Mario Antonello Rosito

De: DANIEL DE CARVALHO DAMIN [damin@terra.com.br]
Enviado em: terça-feira, 16 de julho de 2002 16:41
Para: Mario Antonello Rosito
Cc: DANIEL DE CARVALHO DAMIN
Assunto: En: Manuscript (no: 97/02): Nuclear chromatin texture in rectal cancer: role as a prognostic predictor

— Original Message —

From: IJCD (S. Platzbäcker)
To: Damin@terra.com.br
Cc: H. J. Buhr ; H. Hotz
Sent: Monday, July 15, 2002 9:02 AM
Subject: Manuscript (no: 97/02): Nuclear chromatin texture in rectal cancer: role as a prognostic predictor

Dear colleague Damin,

This is to acknowledge the receipt of your manuscript submitted to the **International Journal of Colorectal Disease, Clinical and molecular Gastroenterology and Surgery**. Like all work submitted for publication in our journal, it is subject to reviewing by out-of-house consultants. Meanwhile your manuscript is sent to the reviewer and we will inform you as soon as we have returned the reviewers' comments.

Sincerely,

H.J. Buhr, MD, FACS, FRCS (Editor-in-Chief)

H.G. Hotz, MD (Assistant Editor)

PS: Impact factor in 2001: 1.709

10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boardman L, Karnes WE Jr. Epidemiology and Etiology. In: Nicholls JR and Dozois RR, eds. Surgery of the Colon & Rectum. New York, NY: Churchill Livingstone Inc; 1997. p. 335-48.
2. Parker SL, Tong T, Boldens S et al. Cancer Statistics 1997; CA 47: 5-27.
3. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures. Available in June 30th 2001 from <http://www.cancer.org/statistics>.
4. Boyle P, Langman JS. Clinical review. ABC of colorectal cancer. Epidemiology. BMJ 2000; 321: 805-08.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer: Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil (2001). Disponível na Internet em 11/04/2002: <http://www.inca.org.br/>.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Datasus. Sistema de Informações sobre Mortalidade. Disponível na Internet em 11/04/2002: <http://www.datasus.gov.br>.
7. 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-TL038.
8. Marcello PW, Schoetz DJ Jr. Surgery for colonic carcinoma. In: Nicholls JR and Dozois RR, eds. Surgery of the colon & rectum. New York, NY: Churchill Livingstone Inc; 1997. p. 411-26.
9. Shepherd NA. Pathology. In: Nicholls JR and Dozois RR, eds. Surgery of the colon & rectum. New York, NY: Churchill Livingstone Inc; 1997. p. 349-63.

10. Gordon PH. Malignant neoplasms of the colon. In: Gordon PH and Nivatvongs S, eds. Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum and Anus. 2nd ed. St.Louis, Missouri: Quality Medical Publishing Inc; 1999. p. 575-717.
11. Beart RW, Melton JL, Maruta M, Dockerty MB, Frydenberg HB, O'Fallon M. Trends in right and left-sided colon cancer. Dis Colon Rectum 1983; 26: 393–98.
12. Gordon PH. Malignant Neoplasms of the rectum. In: Gordon PH and Nivatvongs S, eds. Principles and Practice of Surgery for the Colon , Rectum and Anus. 2nd ed. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing Inc; 1999. p 719–807 .
13. Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini JP, Chaubert P, Benhattar J, Secic M et al. Dukes B colorectal cancer. Distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. Dis Colon Rectum 2001; 44: 364-73.
14. Gonzales EC, Roentzheim RG, Ferrante JM, Campbell R. Predictors of proximal vs. distal colorectal cancers. Dis Colon Rectum 2001; 44: 251-58.
15. Wilmlink ABM. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1997; 40: 483-93.
16. Jass JR. Tumors of the small and large intestines. In: Fletcher CD editor. Diagnostic Histopathology of Tumors. New York, NY: Churchill Livingstone Inc; 1995. p. 243-74.
17. Muto T, Bussey HJR, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer 1975; 36: 2251-70.
18. Muto T, Kamiya J, Sawada T, Konishi F, Sugihara K, Kubota Y et al. Small “Flat adenoma” of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features. Dis Colon Rectum 1985; 28: 847-51.
19. Spratt Jr JS, Ackermann LV. Small primary adenocarcinomas of the colon and rectum. JAMA 1962; 179: 337–46.

20. Mueller J, Mueller E, Hoepner I, Jütting J, Bethke B, Stolte M, et al. Expression of bcl-2 and p53 in de novo and ex-adenoma colon carcinoma: a comparative immunohistochemical study. *J Pathol* 1996; 180: 259-65.
21. Pinho M, Rossi BM. Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. *Rev Bras Coloproct* 1999; 19: 57-60.
22. Thorson AG, Knezetic JA, Lynch HT. A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1-9.
23. Lynch HT, Fritzgibbons R, Marcus J, McGill J, Voorhees GJ, Lynch Jf. Colorectal cancer in nuclear family. Familial or hereditary ?. *Dis Colon Rectum* 1985; 28: 310–16.
24. Lynch HT, Smyrk TC, Lanspa SJ, Jenkins JX, Cavalieri J, Lynch JF. Cancer control problems in the Lynch Syndromes. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 254–60 .
25. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
26. UICC - União Internacional Contra o Câncer. TNM: classificação dos tumores malignos. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão Nacional de Doenças Crônico-Degenerativas 4º ed. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde; 1989: 47-9.
27. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932; 35: 323–32.
28. 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.
29. Astler VA, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139: 846–52.

30. Gunderson LL, Sosin H. Areas of failure found at reoperation (second or symptomatic look) following “curative surgery” for adenocarcinoma of the rectum: clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Cancer* 1974; 34: 1278–92.
31. Ruo L, Guillem JG. Surgical Management of primary colorectal cancer. *Surgical Oncology* 1998; 7: 153-63.
32. O’Connell MJ, Martenson JA, Wieans HS et al. Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted infusion fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med* 1994; 331: 502-07.
33. Swedish rectal cancer trial. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 1997; 336: 980-87.
34. Metha VK, Poen J, Ford J, Edelstein PS, Viersa M, Bastidas AJ, et al. Radiotherapy concomitant protracted-venous infusion 5-fluorouracil, and surgery for ultrasound-staged T3 or T4 rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 52-8.
35. Moreira LF, Teixeira CR. Metástase linfonodal em tumores precoces de reto. *Arq gastroenterol* 1992; 29: 51- 5.
36. Nicholls RJ. Surgery for rectal carcinoma. In: Nicholls JR and Dozois RR, eds. *Surgery of the colon & rectum*. New York, NY: Churchill Livingstone Inc; 1997. p 427-74.
37. McFarlane JK, Ryall RDH, Heald R. Mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1993; 341: 457–60.
38. Nissan A, Guillem JG, Paty PB, Douglas WW, Minsky B, Saltz L, et al. Abdominoperineal resection for rectal cancer at a specialty center. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 27-36.

39. Lopes A, Nakagawa WT, Mello CAL. Oncogenes e Genes Supressores de Tumor: Um equilíbrio necessário. In: Rossi BM e Pinho M. eds. Genética e biologia molecular para o cirurgião. São Paulo, SP: Lemar, 1999 p. 125–42.
40. Ferreira FO, Haddad FJ. Estado atual da Biologia molecular dos tumores. In: Rossi BM e Pinho M. eds. Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião. São Paulo, SP: Lemar; 1999. p. 214-49.
41. Rahman DM, Itakura H. Morphometry in histopathology. An image analysis workstation for the pathology laboratory. *Analyt Quant Cytol Histol* 1996; 18: 471–80 .
42. Azúa J, Romeo P, Morales M, Castiella T, Azúa J Jr. DNA quantification as a prognostic factor in colorectal adenocarcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999; 21: 468 –72.
43. Shackney SE, Smith CA, Miller BW, Burholt DR, Murtha K, Giles HR, et al. A. Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res* 1989; 49: 3344–54.
44. Diest PJ Van, Smeulders AWM, Thunnissen FBJM, Baak JPA. Cytomorphometry. A methodologic study of preparation techniques, selection methods and sample sizes. *Analyt Quant Cytol Histol* 1989; 11: 225–31.
45. Demirkaya O, Cothren RM, Vince DG, Cornhill JF. Automated identification of stained cells in tissue sections using digital image analysis. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999; 21: 93–102.
46. Burns TR, Underwood RD, Greenberg SD, Teasdale TA, Cartwright J Jr. Cytomorphometry of large cell carcinoma of the lung. *Analyt Quant Cytol Histol* 1989; 11: 48–52.

47. Da Silva VD, Montironi R, Thompson D, Bartels HG, Vaught L, Hamilton PW, et al. Chromatin texture in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999; 21: 113–20.
48. Bartels PH, Da Silva VD, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L, et al. Chromatin texture signatures in nuclei from prostate lesions. *Analyt Quant Cytol Histol* 1998; 20: 407–16.
49. Lee JS, Jung JJ, Park CS, Jung SW, Oh BR, et al. Value of morphometric nuclei image analysis using the Feulgen reaction in renal cell carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 2000; 22: 31-6.
50. Rex DK, Alikhan M, Cummings O, Ulbrigh TM. Accuracy of pathologic interpretation of colorectal polyps by general pathologists in community practice. *Gastroint Endosc* 1999; 50: 468- 74.
51. Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin HJ, Riddel RH, Shimoda T, et al. Differences in the diagnostic criteria used by japanese and western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 60-9.
52. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Doglietto GB, Crucitti F. Prognostic factors in colorrectal cancer. Litterature review for clinical application. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 1033–49.
53. Deans GT, Parks TG, Rowlands BJ, Spence RA. Prognostic factors in colorectal cancer. *Br J Surg* 1992; 79: 608–13.
54. Rawett V. Carcinoma Colorretal: estadiamento e parâmetros prognósticos. [Tese de Doutorado]. São Paulo, SP. Universidade de São Paulo; 1998.
55. Hojo K, Koyama Y, Moriya Y. Lymphatic spread and its prognostic value in patients with rectal cancer. *Am J Surg* 1982; 144: 350–54.

56. Cawthorn SJ, Parums DV, Gibbs NM et al. Extent of mesorectal spread and involvement of lateral resection margin as prognostic factors after surgery for rectal cancer. *Lancet* 1990; 335: 1055–59.
57. Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA. Clinical Review. ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risks factors. *BMJ* 2001; 321: 886-9.
58. Rosito MA, Müssnich JFX, Gus P, Conte CO, Almeida ICA, Falkemberg A. Amputações abdomino-perineais de reto: A Experiência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Rev AMRIGS* 1988; 32: 158-62.
59. Rosito MA, Müssnich JFX, Gus P, Weindorfer M, Schaefer LG, Pinheiro PM. Amputação abdomino-perineal de reto em adenocarcinoma de reto. *Rev AMRIGS* 1995; 39: 200-04.
60. Talbot IC, Ritchie S, Leighton MH. The clinical significance of invasion of veins by rectal cancer. *Br J Surg* 1980; 67: 439–42.
61. Mulcahy HE, Toner M, Patchett SE, Daly L, O'Donoghue DP. Identifying Stage B colorectal cancer patients at high risk of tumor recurrence and death. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 326-31.
62. Carraro PGS, Segala M, Cesana BM, Tiberio G. Obstructing cancer: failure and survival patterns over a ten-year follow-up after one-stage curative surgery. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 243-50.
63. Cruz JV. Importância da invasão neural no câncer colo-retal: estudo pela imunohistoquímica com a proteína S-100. [Tese de Doutorado]. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo; 1997.
64. Moreira LF, Kenmotsu M, Gochi N, Orita K. Lymphovascular and neural invasion in low-lying rectal carcinoma. *Cancer Detect Prev* 1999; 23: 123-8.

65. Tarta C. Angiogênese e o potencial maligno do adenocarcinoma colorretal avançado. [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1998.
66. Müssnich HG. Análise da sobrevida e fatores prognósticos em adenocarcinoma de reto médio e distal. [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre. RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
67. Rouanet P, Saint Aubert B, Fabre JM, et al. Conservative treatment for low rectal carcinoma by local excision with or without radiotherapy. *Br J Surg* 1993; 80: 1452-56.
68. Minsky BD. Clinical experience with local excision and postoperative radiation therapy for rectal cancer. *Current Status. Dis Colon Rectum* 1993; 36: 405-09.
69. Kraemer M, Wiratkapun S, Slow-Choen F et al. Stratifying risk factors for follow-up. A comparison of recurrent and nonrecurrent colorectal cancer. *Dis Col Rectum* 2001; 44: 815-21.
70. Grinnel RS. Distal intramural spread of carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Surg Gynecol Obstet* 1954; 99: 421-9.
71. Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS. Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. Histopathological study of lateral spread and surgical excision. *Lancet* 1986; 2: 996-99
72. Quer EA, Dahlin DC, Mayo CW. Retrograde intramural spread of carcinoma of the rectum and rectosigmoid. A microscopic study. *Surg Gynecol Obstet.* 1953; 96: 24-30.
73. Goligher JC, Dukes CE, Bussey HJR. Local recurrences after sphincter saving excisions for carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Br J Surg* 1951; 39: 199-211.
74. Heald RJ, Husband EM, Ryalf RD. The mesorectum in rectal cancer surgery-the clue to pelvic recurrence? *British Journal of Surgery* 1982; 69: 613-6.

75. Surtess P, Ritchie JK, Phillips RKS. High versus low ligation of the inferior mesenteric artery in rectal cancer. *Br J Surg* 1990; 77: 618–21.
76. Hermanek P. Impact of surgeon's technique on outcome after treatment of rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 559-62.
77. Dorrance HR, Docherty GM, O'Dwyer PJ. Effect of surgeon specialty on patient outcome after potentially curative colorectal cancer surgery. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 492-8.
78. McArdle C. Clinical review. ABC of colorectal cancer. Primary treatment-does the surgeon matter ? *BMJ* 2000; 321: 1121-23.
79. Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG, Stearns M, Swartz MK, et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1978; 299: 448–51.
80. Wiggers T, Arends J W, Volovics A. Regression Analysis of prognostic factors in colorectal cancer after curative resections. *Dis Colon Rectum* 1988; 31: 33–41.
81. Wiratkapun S, Kraemer M, Seon-Choen F, Hong Ho Y, Eu KW. High preoperative serum carcinoembryonic antigen predicts metastatic recurrence in potentially curative colonic cancer: results of a five-year study. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 231-5.
82. Moertel CG, O'Fallon JR, Go VLW, O'Connell MJ, Thynne GS. The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58: 603–10.
83. Gus P, Müssnich JFX, Rosito MA, Seben RL, Fraga JCS, Kraemer ES. Antígeno Carcinoembriônico (CEA) pré-operatório em câncer colorretal. Diagnóstico e prognóstico. *Rev HCPA* 1984; 4: 41-6.

84. Steinbeck RG, Heselmeyer KM, Neugebauer WF, Falkmer UG, Auer GU. DNA ploidy in human colorectal adenocarcinomas. *Analyt Quant Cytol Histol* 1993; 15: 187– 94.
85. Araújo SEA, Habr-Gama A, Souza JR AHS, Venco FE, El-Ibraim R. Valor prognóstico do conteúdo celular de DNA (ploidia) e da atividade proliferativa tumoral no câncer colorretal. Comparação com as variáveis clínico-patológicas convencionais. *Rev bras Coloproct* 2000; 20: 178-90.
86. Chen Ws, Chen JY, Liu MJ, Lin WC, King KL, Whang Peng J, et al. Microsatellite instability in sporadic-colon-cancer patients with and without liver metastases. *Int J Cancer* 1997; 74: 470–4.
87. Offerhaus GJ, De Feyter EP, Cornelisse CJ, Tersmette KW, Floyd J, Kern SE, et al. The relationship of DNA aneuploidy to molecular genetic alterations in colorectal carcinoma. *Gastroenterol* 1992; 102: 1612–9.
88. Riesener KP, Füzesi L, Biesterfeld S, Götzen A, Kasperk R, Schumpelick. Prognostic value of DNA image cytometry in resected colorectal hepatic metastases. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999; 21: 311–8.
89. Sampedro A, Urdiales G, Martinez-Nistal A, Riera J, Hardisson D. Prognostic value of DNA image cytometry in colorectal carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 1996; 18: 214–20.
90. Fernández-López F, Paredes-Cotré JP, Fortaleza-Vila J, Path MRC, Puente-Domínguez JL, Potel-Lesquereux J. Prognostic value of nuclear morphometry in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 386-92.
91. Mitmaker B, Begin LR, Gordon P. Nuclear shape as a prognostic discriminant in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 249–59.

92. Berezney R, Mortillaero MJ, Ma H, Wei X, Samarabandu J. The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol* 1995; 162A: 1–65.
93. Fawcett DW. *An atlas of fine structure: the cell, its organelles, and inclusions.* Philadelphia,; W. B. Saunders CO.; 1996.
94. Bernhard W, Granboulan N. The fine structure of the cancer cell nucleus. *Exp cell Res* 1963; 9 (suppl.): 19–53.
95. Smetana K, Lejnar J, Vlastiborova A, Busch H. On interchromatinic dense granules of mature human neutrophil granulocytes. *Exp cell Res* 1971; 64: 105–12.
96. Davie JR. The nuclear matrix and the regulation of chromatin organization and function. *Int Rev Cytol* 1995: 191–250.
97. Getzenberg RH, Pienta KJ, Ward WS, Coffey DS. Nuclear structure and the three-dimensional organization of DNA. *J Cell Biochem* 1991; 47: 289–99.
98. PientaKJ, Getzenberg RH, Coffey DS. Cell structure and DNA organization. *Crit Rev Eukayot Gene Expr* 1991; 1: 355–85.
99. Fakan S, Puvion E, Sphor G. Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolate rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 1976; 99: 155–64.
100. SFey EG, Penman S. Nuclear matrix protein reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 121–5.
101. Stuurman N, Meijne AM, Van der Pol AJ, De Jong L, Van Renswoubde J. The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *J Biol Chem* 1990; 265: 5460–5.
102. Kamel HM, Kirk J, Toner PG. Ultra structural pathology of the nucleus. *Curr Top Pathol* 1990; 82: 17–89.

103. 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). *Int J Oncol* 1998; 13: 827–37.
104. 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: 774–6.
105. Pienta KJ, Lehr JE. A common set of nuclear matrix in prostate cancer cells. *Prostate* 1993; 23: 61-7.
106. Khanuja PS, Lehr JE, Soule HD, Gehani SK, Noto AC, Choudhury S, et al. Nuclear matrix proteins in normal and breat cancer cells. *Cancer Res* 1993; 53: 3394-8.
107. Keesee SK, Meneghini MD, Szaro RP, Wu YJ. Nuclear matrix proteins in human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 9: 1913–6.
108. Keesee SK, Marchese J, Meneses A, Otz D, Garcia-Cuellar Z, Szaro RP, et al. Human cervical cancer-associated nuclear matrix proteins. *Exp Cell Res* 1998; 244: 14–25.
109. Stonier T. Introducion. In: Stonier T. editor. *Information and meaning: an evolutionary perspective*. New York; 1997. p. 1–9.
110. Bartels PH. Quantitation in histopathology: Objectives, origins, digital image analysis and unresolved issues. In: Machevsky AM, Bartels PH, edictors. *Image analysis: a primer for pathologists*. New York: Raven Press; 1994. p. 1–28.
111. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-8.
112. Wied GL, Bartels PH, Bahr GF, Oldfield DG. Taxonomic intra-cellular analytic system (TICAS) for cell identification. *Acta Cytol* 1968;12: 180-204.

113. Bartels PH, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L, Bartels HG. Nuclear chromatin texture in prostatic lesions. I. PIN and adenocarcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 1998; 20: 389-96.
114. Bartels PH, Montironi R, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L, Bartels HG. Nuclear chromatin texture in prostatic lesions. II. PIN and malignancy associated changes. *Analyt Quant Cytol Histol* 1998; 20: 397-406.
115. 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.
116. Meurer L. Avaliação morfométrica e densimétrica através de assinatura nuclear digital em biópsias de esôfago. [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
117. Bersch VP. Cariometria em adenocarcinoma de Pâncreas por análise de imagem digital. [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
118. Scarpelli M, Baccarini MG, Colanzi P, Arnaldi G, Montironi R, Thompson D, et al. Chromatin texture analysis at cortical adrenal gland adenomas including incidentalomas and adjacent normal appearing cortical tissue. *Analyt Quant Cytol Histol* 2000; 22: 235-43.
119. Da Silva VD, Prolla JC, Sharma P, Sampliner R, Thompson D, Bartels PH. Kariometry in Barrett's esophagus. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23: 40-6.
120. Garcia FAR, Davis JR, Alberto DS, Hatch k, Weyn B, Thompson D, et al. Nuclear chromatin patterns in normal, hyperplastic and atypical endometrium. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23: 144-50.

121. Bibbo M, Michellassi 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: 147–55.
122. Weibel ER. Stereological methods. In: Weibel ER, editor. *Stereological methods: practical methods for biological morphometry*. New York: Academic Press; 1980.
123. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 1988; 96: 379-94.
124. 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.
125. Bunsen RW, Roscoe HE. Photochemische Untersuchungen. *Poggendorf's Annalen* 1862; 1: 529.
126. Köhler A. Mikrophotographische untersuchungen mit ultravioletem Licht. *Z wiss Mikroskopie* 1904; 21: 129-165, 272-304.
127. Mainland D. Colorimetric tests of nuclear staining. *Stain Technol* 1933; 8: 69-72.
128. Atkin NB, Richards BM. Deoxyribonucleic acid in human tumors as measured by microspectrophotometry of Feulgan stain. *Br J Cancer* 1956; 10: 769-86.
129. Bibbo M, Bartels PH, Bahr GF, Ng AB, Reagan JW, Richards DL, et al. Data bank for endometrial cells. Operation of the TICAS file project. *Acta Cytol* 1970; 14: 574-82.
130. 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.

131. Inoué S, Spring KR. Glossary. In Inoué S, Spring KR, editors. Video Microscopy. New York: Plenum Press; 1997. p. 664.
132. Cohen C. Image cytometric analysis in pathology. *Hum Pathol* 1996; 27: 482-93.
133. Marchevsky AM, Erlen BS. Morphometry in pathology. In: Marchevsky AM, Bartels PH eds. Image analysis-a primer for pathologists. New York: Raven Press; 1994. p.125-80.
134. Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd ed. New York: W.H.Freemann; 1995.
135. 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.
136. Bartels PH, Bibbo M, Graham AR, Paplanus S, Shoemaker RL, Thompson D. Image understanding system for histopathology. *Ann Cell Pathol* 1989;1: 195-214.
137. 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; 1994. p. 273-88.
138. 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.
139. Partin Aw, Steiberg GD, Pitcock RV, Wu L, Piantadosi S, Coffey DS, et al. Use of nuclear morphometry, Gleason histologic scoring, clinical stage, and age to predict disease-free survival among patients with prostate cancer. *Cancer* 1992; 70: 161-8.
140. Steven A. The haematixilins. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. Theory and Practice of Histological Techniques. 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 1990. p. 107-18.

141. 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.
142. Mariuzzi GM, Montironi R. Quantitative microscopy and index formulation in continuous pathologic lesions. *Appl Pathol* 1986; 4: 43-7.
143. Kramer MS. Life table(survival) analysis. In: Kramer MS, ed. Clinical epidemiology and biostatistics. 1st ed. Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1988. p. 236-53.
144. Altman DG. Analysis of survival times. In: Altman DG, ed. Practical statistics for medical research. 1st ed. Boca Raton, London, New York, Washington D. C. : Chapman & Hall/CRC; 1991. p. 365-95.
145. Zar HJ. Biostatistical Analysis. Upper Saddle River; Prentice Hall Inc., New Jersey 07458, 1996.
146. Rothman K. Multivariate analysis. In: Rothman K, ed. Modern epidemiology. 1st ed. Boston: Little, Brown and Co.; 1986. p. 48-73.
147. Hopkins WG. New View of Statistics: Effect Magnitudes, 1997. <http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html>.
148. 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.
149. Cole TRP, Sleightholme HV. The role of clinical genetics in management. ABC of colorectal cancer. *BMJ* 2000; 321: 943-6.
150. Midgley R, Kerr D. Colorectal cancer. *Lancet* 1999; 353: 391-9.

151. Dukes CE, Bussey HJR. The spread of rectal cancer and its effects on prognosis. *Br J Cancer* 1958; 12: 309–20.
152. Hermanz de La Fuente F, Revolta S, Redondo C, Madruzzo C, Castilho C, Gomez FM. Colorectal adenocarcinoma: quality of the assesment of lynphonode metastases. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 373–7.
153. Fisher ER, RobinskyB, SassR, Fisher B. Relative prognostic value of the Dukes and Jass systems in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 944–9.
154. Bhatavdekar JM, Patel DD, Ghosh N, Chinklikar PR, Trivedi TI, Shuthar TP. Coexpression of bcl-2, c myc and P 53 oncoproteins as prognostic discriminants in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 785–90.
155. Jass JR, Atkin WS, Cuzis J, Bussey HJR, Morson BC, Northover JMA, Todd IP. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivatiatie analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986; 10: 437–59.
156. Oin H, Sirivongs P, Rothenberger M, Rothenberger D, Garcia-Aguilar J. Molecular Prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 451–9.
157. Mac Aulay C, Lam B, Payne W, Le Richie C, Palcic I. Malignancy associated changes in bronchial epithelial cell in biopsy specimens. *Analytic Quant Cytol Histol* 1995; 17: 55–67.
158. Roels S, Ducatelle R, Cornelissen H. Quantitative image analysis for follow-up of liver biopsies from a Toucan with hemochromatosis. *Analytic Quant Cytol Histol* 1996; 18: 221–4.

159. Kneits S, Ott G, Albert R, Schindewolf T, Hermelink HKM, Harms H. Differentiation of low grade non-Hodgkins lymphoma by digital image processing. *Analyt Quant Cytol Histol* 1996; 18: 121–8.
160. Bostwick DG. Practical clinical application of predictive factors in prostata cancer. *Analyt Quant Cytol Histol* 1998; 20: 323–42.
161. Wein B, Tjalma W, Van de Wouner G, Van Doele A, Scheunders P, Jacob W, Van Marc E. Validation of nuclear texture, density, morphometry and tissue syntatic structure analysis as prognostictions of cervical carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 2000; 22: 373–82.
162. Scarpelli M, Montironi R, Mazzacchelli R, Thompson D, Bartels PH. Distinguishing cortical adrenal gland adenomas from carcinomas by their quantitative nuclear features. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999; 21: 131–8.
163. Protopapa E, Delides G, Miaoulis G, Thompson D, Bartels PH. Image analysis of mesothelioma I. Differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma of the lung. *Analyt Quat Cytol Histol* 2000; 22 114–22.
164. Hittelet AB, Yeaton P, Dacastecker C, R Emmelink M, Nagy N, Cremer M, et al. Discriminant between dysplastic and malignant epithelium of the ampulla of Vater based on quantitative image cytometric data. *Analyt Quant Cytol Histol* 2000; 22: 98–106.
165. Frank DH, Davis JR, Alberts DS, Thompson D, Liu Y, Bartels PH. Nuclear chromatin characteristics of breast solid pattern ductal carcinoma in situ. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23: 418–26.
166. Bartels PH, Garcia FAR, Davis J, Da Silva VD, Bartels H, Thompson D. Progressive curves for endometrial lesions. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23: 1–8.

167. Da Silva VD, Prolla JC, Diehl ARS, Müller RL. Comparison of conventional microscopy and digitalized imaging for diagnosis in serous effusions. *Analyt Quant Cytol Histol* 1997; 19: 202–6.
168. Mairinger T, Happacher R, Gabl C, Hoffmann Y, Ögner D, Schmid KW, et al. Mean weighted nuclear volumes in colonic adenocarcinomas. Evaluation of prognostic significance. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999; 21: 194–200.
169. Montag A, Bartels PH, Dytch HE, Puertas HL, Michelassi F, Bibbo M. Kariometric features in nuclei near colonic adenocarcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 1991; 13: 159–67.
170. Bibbo M, Michelassi F, Bartels PH, Dytch H, Bania C, Lerma H, et al. Karyometric marker features in normal-appearing glands adjacent to human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 147–51.
171. Arnould M, Young DM, Hitchcock CL, Barbera-Guillem E, Nieroda C, Martin jr.EW. Staging of colorectal cancer:biology vs. Morphology. *Dis Colon Rectum* 1998; 41; 1482–7.
172. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990; 322: 352–8.
173. 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.
174. Bartels PH, Thompson D, Bibbo M, Weber JE. Bayesian belief network in quantitative histopathology. *Anal Quant Cytol Histol* 1992; 14: 459–73.

175. Millonig G. Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions in fixation. *J Appl Physiol* 1961; 32: 1637.
176. Kelleberger E, Ryter, Sechaud J. Electron microscope study of DNA containing plasma. II vegetative and mature phase DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J Biophys Biochem Cytol* 1958; 4: 461.
177. Reynolds ES. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17: 209.