

RONALDO MAFIA CUENCA

**ESTUDO CITOFOTOMÉTRICO COMPARATIVO DO ADN ENTRE O  
CARCINOMA GÁSTRICO DA PEQUENA E GRANDE CURVATURAS  
DO ESTÔMAGO**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Doutor. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

Co-Orientador: Prof. Dr. Plínio Gasperin Júnior

**CURITIBA**

**2000**

Cuenca, Ronaldo Mafia  
ESTUDO CITOFOTOMÉTRICO COMPARATIVO DO ADN ENTRE O CARCINOMA  
GÁSTRICO DA PEQUENA E GRANDE CURVATURAS DO ESTÔMAGO – Curitiba,  
2000.

79 p. : il

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia.  
Tese (Doutorado)/Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do  
Paraná.

1. Estudo citofotométrico. 2. ADN. 3. Câncer gástrico

I. Título

À Deus,  
a quem tudo devemos,  
agradeço pela minha vida.

Aos meus pais,  
Dorival e Jeanette a quem tudo devo,  
a minha gratidão e meu eterno respeito.

À minha esposa,  
Marta que participou na construção de mais  
este capítulo da nossa vida;  
aos meus filhos Lucas e Lorena, que ainda não  
entendem,  
mas que cederam muitas horas do nosso  
convívio e são o grande estímulo para o meu  
crescimento profissional.

Aos meus irmãos,  
Suzette e Evandro  
pelo grande incentivo.

A minha sogra,  
Paulina e aos meus cunhados,  
Sérgio, Marlene e Marcos,  
pelo apoio e reconhecimento.

Como a lagosta, nós também precisamos nos libertar de uma estrutura protetora a cada passagem de uma etapa do crescimento para outra. Isso nos deixa expostos e vulneráveis, mas também nos devolve a condição de embrião, que possibilita o crescimento e nos capacita a nos esticar de maneiras antes desconhecidas.

Gail Sheelley

## AGRADECIMENTOS

“Qualquer destino, por mais longo e complicado que seja, vale a pena por um único momento: aquele em que o homem compreende de uma vez por todas quem é”.

**Jorge Luiz Borges**

A todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho, **sinceros agradecimentos:**

Ao **Prof. Dr. OSVALDO MALAFAIA**, orientador deste trabalho, pelos ensinamentos, apoio e estímulo nas várias etapas não somente deste trabalho, mas na minha formação profissional e vida pessoal, o meu eterno reconhecimento e gratidão.

Ao **Prof. Dr. ANTONIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pelo incentivo e compreensão.

Ao **Prof. Dr. PLÍNIO GASPERIN JÚNIOR**, co-orientador desta pesquisa como profundo conhecedor deste assunto, procurou passar seus ensinamentos de forma clara e sempre estando disponível a trabalhar em busca da verdade.

Ao **Dr. ERICKSON JOSÉ BLUN LIMA**, amigo, como poucos podemos encontrar na vida, tem uma participação importante na minha vida profissional, no desenvolvimento deste trabalho a sua participação foi fundamental em todas as etapas.

Ao **Prof. Dr. VINÍCIUS BUDEL**, a sua participação é decisiva nesta linha de pesquisa, através dos seus ensinamentos, não somente este trabalho mas muitos outros tiveram e terão êxito.

Ao **Prof. Dr. CONSTANTINO MIGUEL NETO**, diretor geral do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba que engloba o IPEM, que proporciona condições para realização de várias pesquisas nesta Instituição.

A **Dra. CARMEM RIBAS**, pelo auxílio no entendimento da técnica da citometria.

Aos **Drs. CÁSSIO ZANDONÁ E JEAN FRANCISCO FURTADO**, colaboraram no desenvolvimento desta linha de pesquisa com seus ensinamentos e domínio no assunto.

À **bióloga MÁRCIA REGINA INÁCIO**, que nunca mediu esforços para obter todas as imagens que deram origem a este trabalho.

Aos **Profs. Drs. PAULO NASSIF, NICOLAU G. CZECZKO E JURANDIR MARCONDES RIBAS**, eternos amigos e orientadores na formação da minha vida profissional como cirurgião.

Ao **Dr. LUIZ FERNANDO CÓRDOVA**, irmão de trabalho, de pensamentos, das dificuldades e soluções na vida nova que iniciamos juntos em Brasília.

À **Dra. MARILIZ ANTUNES LIMA**, amiga, no momento mais difícil da minha vida, acolheu minha família na sua casa durante a mudança para Brasília.

Aos eternos amigos de Curitiba **ANDRE L. MADUREIRA E MIRABEL, MURILO MARCONDES, PAULO BETTES E GISELE, CATIA NASSIF**, a lembrança dos bons momentos.

Aos novos amigos em Brasília **RÓGERIO FREITA E ELIANE, ELIZER SOARES E REGINA, FREDERICO COSTA E JACIARA, KARINA PALOMARES CÓRDOVA, MOACIR E ROBERTA ZANATA**, pela amizade e apoio nesta nova fase da minha vida.

Às secretárias **EDLAINE ARAÚJO SANTOS E MARLEI VIEIRA RIBEIRO**, pelo carinho e ajuda durante o período do Programa de Pós-Graduação.

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	xi
	<b>RESUMO</b> .....	xii
	<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1	OBJETIVO.....	3
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
2.1	O VALOR DA CITOMETRIA NA PESQUISA DO CÂNCER.....	5
2.2	COLORAÇÃO DE FEULGEN.....	8
2.3	POTENCIALIDADE CLÍNICA DA CITOFOTOMETRIA.....	10
2.4	A CITOMETRIA E OS TUMORES GÁSTRICOS.....	13
3	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	23
3.1	AMOSTRA.....	23
3.2	OBTENÇÃO DO MATERIAL DESTINADO À ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	23
3.2.1	Preparo do material histopatológico.....	24
3.3	OBTENÇÃO DO MATERIAL DESTINADO À ANÁLISE CITOFOTOMÉTRICA.....	24
3.4	COLORAÇÃO DE FEULGEN.....	25
3.5	ORGANIZAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA SAMBA 4000.....	25
3.5.1	Equipamentos componentes.....	25
3.5.2	Programa computacional ( <i>software</i> ).....	27
3.6	PROCEDIMENTO DE LEITURA.....	29
3.7	PARÂMETROS MATEMÁTICOS CALCULADOS PELO COMPUTADOR.....	31
3.7.1	Parâmetros morfométrico – área nuclear.....	31
3.7.2	Parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular.....	31
3.7.3	Parâmetro ligados à textura da cromatina nuclear.....	32

3.8	ESTUDO ESTATÍSTICO.....	33
3.8.1	Estudo estatístico multivariado.....	33
4	<b>RESULTADOS</b> .....	36
4.1	AMOSTRA.....	36
4.2	ANÁLISE MULTIVARIADA.....	37
4.2.1	Transformação canônica dos dados e geração do banco de dados morfonucleares.....	37
4.3	PARÂMETROS MATEMÁTICOS CALCULADOS PELO COMPUTADOR.....	39
4.3.1	Parâmetro morfométrico – área nuclear.....	39
4.3.2	Parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular.....	40
4.3.3	Parâmetro ligados à textura da cromatina nuclear.....	43
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	48
5.1	ASPECTO HISTÓRICOS DA ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGEM.....	48
5.2	BIOLOGIA TUMORAL.....	49
5.3	CÂNCER GÁSTRICO.....	50
5.4	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	51
5.5	CITOMETRIA DO ADN.....	53
5.5.1	Sistema SAMBA 4000: Software e seus parâmetros.....	55
5.6	TRANSFORMAÇÃO CANÔNICA E GERAÇÃO DO BANCO DE DADOS.....	56
5.7	ANÁLISE DOS PARÂMETROS MATEMÁTICOS CALCULADOS PELO COMPUTADOR.....	57
5.7.1	Variável morfométrica.....	57
5.7.2	Variáveis densitométricas.....	57
5.7.2.1	Parâmetros 2 e 4.....	58
5.7.3	Variáveis texturais.....	58
5.7.3.1	Parâmetros derivados das matrizes de coocorrência.....	59
5.8	<i>FACIT</i> .....	59
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	62

<b>ANEXOS.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

1	Análise estatística multivariada, com transformação canônica que representa os núcleos das amostras da pequena curvatura (azuis) e grande curvatura (verde), analisando os 15 parâmetros. Nesta representação gráfica temos aproximadamente 2702 núcleos e 95% deles estão dentro das elipses.....	38
2	Projeção da linha discriminante de Fisher sobre a população nuclear da função canônica representada no gráfico 1.....	38
3	Representação gráfica da população nuclear derivada da Segunda filtragem matemática.....	39
4	Média +/- erro padrão da média da área nuclear dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.....	40
5	Média =/- erro padrão da média do parâmetro densidade óptica integrada dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.....	42
6	Média +/- erro padrão da média do parâmetro coeficiente de assimetria ou Índice de "Skewness" dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.....	43
7	Média +/- erro padrão da média do parâmetro média local das matrizes de coocorrência dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.....	45
8	Média +/- erro padrão da média do parâmetro energia ou segundo momento das matrizes de coocorrência dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.....	45
9	Média +/- erro padrão da média do parâmetro contraste das matrizes de coocorrência dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.....	46

## RESUMO

O câncer gástrico é um tumor cuja a sua agressividade varia de acordo com a sua localização e tipo histológico. A sua incidência no Brasil, assim como em outras partes do mundo está em declínio e ocupa o quarto lugar na incidência das doenças malignas. Devido a sua alta incidência e em alguns países o aumento da mortalidade, vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de melhor conhecer esta patologia e conseqüentemente obter melhores resultados com os tratamentos atuais e novas descobertas. O presente estudo, fazendo parte de linha de pesquisa visa estudar os núcleos dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvatura do estômago. Utilizaram-se 28 casos de tumores malignos do estômago, sendo 12 da grande curvatura e 16 da pequena, todos de origem de material de arquivo emblocados em parafina. Após a desparafinização e destruição das estruturas celulares com exceção do núcleo, procedeu-se à realização do esfregaço citológico dos núcleos e à coloração pela técnica de FEULGEN. Realizou-se a citofotometria do ADN mediante o equipamento SAMBA 4000. Os resultados foram comparados entre a pequena e grande curvaturas do estômago pelo estudo de 15 parâmetros matemáticos. No parâmetro morfométrico, área nuclear (parâmetro 1) encontrou-se como média da área nuclear para os núcleos dos tumores da pequena curvatura de 9.343 pontos de imagem e de 8.850 pontos de imagem para os núcleos dos tumores da grande curvatura. Os parâmetros ligados a densitometria do núcleo celular, densidade óptica integrada (parâmetro 2), encontrou-se como média 2.545 unidades arbitrárias (u. a.) para os núcleos da pequena curvatura e de 2.242 u.a. para os núcleos da grande curvatura; coeficiente de assimetria ou Índice de "Skewness" (parâmetro 4) encontrou-se como média 3,12 u.a. para os tumores da pequena curvatura e de 1,85 u.a. para os tumores da grande curvatura do estômago. Nos parâmetros ligados à textura da cromatina nuclear, média local das matrizes de coocorrência (parâmetro 12), encontrou-se como média 153 u.a. e 160 u.a. para a pequena e grande curvatura respectivamente; segundo momento ou energia das matrizes de coocorrências (parâmetro 13) apresentou média de 11,20 u.a. para a

pequena curvatura e 10,04 u.a. para a grande curvatura; contraste das matrizes de coocorrência (parâmetro 15) observou-se média de 566 u.a. e 485 u.a. para a pequena e grande curvaturas respectivamente. Os parâmetros 1, 2, 4, 13 e 15 apresentaram diferença extremamente significativas enquanto o parâmetro 12 apresentou diferença significativa. Conclui-se que: 1) A citofotometria do ADN dos núcleos das células dos tumores malignos do estômago da pequena e grande curvaturas, foi capaz através de seis parâmetros (1, 2, 4, 12, 13 e 15) dos quinze estudados, diferenciar os núcleos da pequena e grande curvaturas; 2) Mesmo não tendo a informação da localização anatômica prévia do tumor, através do estudo destes parâmetros, pode-se afirmar a sua localização.

## ABSTRACT

The gastric cancer is a tumor which aggressiveness varies according to its localization and histological type. The rate incidence in Brazil, excluding the skin cancer, is on sixth place among males and on fourth place among females. Due to its high incidence and, in some countries, the increase in the mortality rate, many studies have been done with the aim to acknowledge this pathology better and consequently obtain better results from the current treatments and new findings. The present study, part of the research line, aims to study the gastric carcinoma nucleus from the small and great stomach curvatures. Twenty-eight cases of malignant tumors of the stomach were used, twelve from the great curvatures and sixteen from the small ones, all from file materials blocked into paraffin. After taking the paraffin off and destroying the cell structures, with the exception of the nucleus, a cytological varnish of the nucleus and a coloration by the FEULGEN technique were done. A DNA cytophotometry was done through the SAMBA 4000 equipment. The results were then compared between the small and great curvatures of the stomach by the study of 15 mathematical parameters. In the morphometric parameter, the nuclear area (parameter 1) had a nuclear average area for the nucleus of the small curvature tumors of 9.343 spots of image and 8.850 spots for the great curvature tumors. The parameters related to the densitometry of the cellular nucleus, integrated optical density (parameter 2), had an average of 2.545 arbitrary units (a.u.) for the small curvature nucleus and of 2.242 a.u. for the great curvature nucleus; the coefficient of asymmetry or "Skewness" indicator (parameter 4) had an average of 3,12 a.u. for the small curvature tumors and of 1,85 a.u. for the great curvature tumors of the stomach. The parameters related to texture and nuclear chromatin, the local average for the main occurrences (parameter 12), had an average of 153 a.u. and 160 a.u. for the small and great curvature respectively; according to the moment or to the energy of the main occurrences (parameter 13) there was an average of 11,20 a.u. for the small curvature and 10,04 a.u. for the great curvature; contrasted to the main occurrences (parameter 15), it was possible to observe the average of 566 a.u. and 485 a.u. for the small and great

curvature respectively. The parameters 1, 2, 4, 13 e 15 showed an extremely significant difference while the parameter 12 showed a significant difference. It is possible to conclude that: 1) the DNA cytophotometry of the cell nucleus of malignant tumors of the stomach from the small and great curvatures was able to differ, through the six parameters (1, 2, 4, 12, 13 e 15) from the fifteen studied, the small and the great curvatures; 2) although there is no information of the previous anatomic localization of the tumor, through the study of these parameters, it is possible to affirm its localization.



## 1 INTRODUÇÃO

As proliferações teciduais de comportamento maligno já era reconhecida por HIPÓCRATES (460-355a.C.) e GALENO (201d.C.) que as descreveram de acordo com a sua forma e manifestações. Apenas no século dezoito estas proliferações teciduais foram melhores estudadas com o surgimento da anatomia-patológica. Com o surgimento de novos recursos como a microscopia e técnicas de coloração, vários autores COHEINM (1839, 1894), VIRSHOW (1821, 1902) e TIERSH (1821, 1895), desenvolveram as teorias sobre as variações teciduais. As neoplasias do aparelho digestivo constituem-se em importantes problemas da patologia humana. As diferenças de freqüência destas neoplasias no planeta, assim como suas implicações etiopatogênicas, possuem variações intrigantes. Os primeiros relatos de tumores do estômago foram descritos por Morgani em 1761. A partir de então, o câncer gástrico apresentou progressivo aumento da sua incidência e conseqüente aumento da taxa de mortalidade na grande maioria dos países. Mais recentemente, o Japão representa exceção, pois devido os investimentos no diagnóstico precoce, conseguiu diminuir a mortalidade da doença. No Brasil, assim como em outras partes do mundo a incidência do câncer gástrico está diminuindo e ocupa a quarta causa das doenças malignas.

O estudo anátomo-patológico é fundamental no planejamento diagnóstico e terapêutico de pacientes portadores tumores malignos. Mas mesmo com um estadiamento histopatológico criterioso, as inumeras variações dos tumores muitas vezes surpreendem a medicina, demonstrando que apenas as informações colhidas em uma lâmina histológica não permitem um diagnóstico anátomo-patológico seguro. Desta forma o estudo mais detalhado da biologia tumoral pode fornecer informações de grande valia no tratamento das doenças malignas.

Nas últimas décadas o desenvolvimento de novos recursos proporcionou estudos das alterações celulares que ocorrem no núcleo celular. A partir de KATEMENSKI e MELAMED (1967) que desenvolveram a tecnologia da citometria de

fluxo (que é a precursora deste trabalho), estas alterações celulares foram melhor estudadas. A citometria de fluxo se baseia na intensidade da luz que é emitida por determinada suspensão celular, previamente preparada, captada por um feixe de raio laser, que será quantificada. Esta luminosidade emitida é diretamente proporcional a quantidade de ácido desoxirribonucléico (ADN) contida no núcleo celular.

HEDLEY, (1983) descreveu técnica que permite o estudo em material de arquivo, possibilitando a correlação da medida da ploidia com as informações clínicas, auxiliando no estabelecimento de critérios de agressividade tumoral. No preparo do material a ser examinado, após destruição do que não é núcleo, fica o ADN que é corado pelo método de Feulgen. Transforma-se a sua carga de ADN em imagem numérica, que é quantificada por computador em parâmetros pré-estabelecidos. A imagem numérica do ADN permite o cálculo e a interpretação de quinze diferentes parâmetros, que serão descritos posteriormente.

## 1.1 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

- 1) Avaliar as características morfonucleares de núcleos do carcinoma gástrico, comparando-se os tumores da pequena e grande curvaturas;
- 2) Verificar se suas diferenças podem permitir de maneira independente reconhecer sua localização.

2 REVISÃO DA LITERATURA

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O VALOR DA CITOMETRIA NA PESQUISA DO CÂNCER

O estudo das modernas técnicas, como citometria de fluxo e a citometria por imagem, permitem avaliação do ADN das células tumorais e assim tem permitido reavaliação da conduta terapêutica e do prognóstico das entidades médicas que estão intimamente relacionadas com o tratamento da doença oncológica.

HALL & FU (1985) estudaram a utilização da microscopia quantitativa na patologia tumoral. Relataram que a microscopia quantitativa existe há mais de cem anos mas somente agora influencia significativamente no diagnóstico patológico. Relatam também que os dados presentes nesta revisão revelam claramente utilidade da microscopia quantitativa nuclear para o diagnóstico, graduação de tumores malignos e grau de agressividade. Muitos estudos estão sendo feitos com poucos casos e pouco material analisado o que pode justificar variações entre os laboratórios. Vários fatores poderão evitar estas diferenças, como armazenamento de imagens com sistema laser e melhoria na inteligência artificial e automação. Portanto, esta técnica pode auxiliar o patologista a melhorar as suas decisões.

COLLAN, TORKKELI, KOSMA, PESOSEN, KOSUNEN e JANTUNEN (1987) estudaram os resultados da análise morfométrica realizada em dois diferentes laboratórios. No primeiro experimento, com a atuação de um único pesquisador, foi estudado a área nuclear de cortes histológicos de câncer de bexiga. No outro experimento houve a atuação de dois grupos de pesquisadores também analisando câncer de bexiga. Quando comparado os resultados, observou-se que as variações foram mais frequentes quando avaliadas entre os pesquisadores. Desta forma, pode-se estimar que para chegar a um resultado preciso é necessário analisar número maior de núcleos.

DANOVA, MAZZINI, WILSON, UCCI, DIONIGI, RICCARDI e FIOCCA (1987) estudaram o ADN através da citometria de fluxo, comparando material a fresco e material de arquivo em bloco de parafina, obtido de biópsias gástricas em 5 pacientes com mucosa histologicamente normal e de nove outros casos submetidos à gastrectomia radical por câncer gástrico. Foi analisado a ploidia e a distribuição de núcleos em suas diferentes fases. Todas as amostras de mucosa normal mostraram conteúdo do tipo diploide. A distribuição euploide de ADN foi encontrado tanto no material a fresco como no parafinado. A quantidade de células em fase S no tecido normal e a fresco foi de 9% e nos tecidos com tumores foi 11,9%. No material de arquivo a quantidade de células na fase S foi encontrado 10% para os tecidos normais e 15% para os casos de tecidos tumorais. A atividade proliferativa foi estatisticamente maior nos tumores do que na mucosa normal. A citometria de fluxo de ADN também foi comparada entre o material com tecido tumoral e tecido a normal.

MAYALL (1988) estudou as capacidades e aplicações clínicas da citometria de imagem. Os resultados revelam significativa importância clínica no uso da metodologia, e sugere que muitos outros casos sejam estudados para comprovar a viabilidade do método na clínica diária. Sua aplicabilidade tem importância não somente no prognóstico mas também na avaliação dos resultados terapêuticos das lesões malignas e pré-malignas. Conclui que a citometria de fluxo e de imagem irá melhorar a qualidade dos tratamentos.

BEGG, HOFLAND, MOONEN, BARTELINK, SCHRAUB, BONTEMPS, LE FUR, VAN DEN BOGAERT, CASPERS, VAN GLABBEKE e HORIOT (1990) analisaram o valor prognóstico da medida da cinética celular nos pacientes submetidos ao tratamento radioterápico com fracionamento básico do câncer avançado de cabeça e pescoço e comparado com tratamento radioterápico com fracionamento acelerado. O Grupo controle utilizou o tratamento radioterápico com fracionamento clássico. Foi injetado endovenosamente iododeoxyuridina antes do tratamento, e foi coletada biópsia tumoral após o tratamento radioterápico. O

potencial de duplicação tumoral foi medido utilizando a citometria de fluxo. Os pacientes foram divididos em potencial de duplicação tumoral rápida, média e lenta. No tratamento com fracionamento acelerado, houve pequena diferença no controle da doença, entre os tumores de crescimento rápido e lento. Os resultados preliminares do estudo da cinética celular podem ser úteis para orientar o melhor tratamento destes tipos de tumores.

KUWANO & SUGIMACHI (1990) realizaram a análise citofométrica de ADN em carcinomas gástricos e esofágicos. Em 35 casos de carcinoma mucoso e submucoso do esôfago, pacientes com os tipos I e II tiveram curso pós-operatório tranqüilo e sem recidiva, enquanto três de 15 (20%) e 5 de nove (55,6%) com tipos III e IV, respectivamente, morreram devido a recidivas. A citometria de imagem do ADN utilizando biópsia esofágica em 75 pacientes com câncer esofágico em seus vários estágios, também mostrou relação muito próxima de distribuição de ADN e o prognóstico. O modo de crescimento e a ploidia de ADN da mucosa gástrica com câncer foi bem relacionada na investigação de 66 casos. Os resultados sugerem o alto potencial de utilização da análise citofotométrica de ADN para os prognósticos, especialmente nos estágios precoces de tumores.

KISS, GASPERIN JÚNIOR, VERHERS e PASTEELS (1992) estudaram a influência de cinco populações de núcleos celulares considerados como padrão diplóide para o estudo comparativo do carcinoma mamário humano. Foram utilizado 4 tecidos normais ( linfócitos, tireóide, fígado e bexiga ) e células mamárias normais que estavam presentes ao redor do tumor mamário. Realizaram a determinação do tamanho nuclear e estudo do ADN mediante a análise computadorizada de imagem (SAMBA 2005), a partir de núcleos corados pela técnica de FEULGEN. Com esta metodologia e com amparo na coloração simultânea das lâminas, bem como na leitura delas em padrão idêntico da calibração, é possível localizar a disposição de pico diplóide no eixo X (número absoluto), o que permite determinar o tipo de histograma da referida amostra de carcinoma mamário.

DORMAN, WALSH, DROOGAN, CURRAN, HOURIHANE, HENNESSY e LEADER (1992) compararam a quantificação do ADN de células de carcinoma

epidermóide de esôfago através da citometria de fluxo e citometria de imagem, utilizando material histológico parafinado. As vantagens potenciais da citometria de imagem incluem a identificação de controle seguro da população celular; impedimento de avaliação de estroma não-tumoral e núcleo celular de células inflamatórias, fragmentos nucleares, núcleos celulares degenerados, o que não é possível com a técnica da citometria de fluxo quando utilizado material arquivado.

MELLIN, HEIDL, KELLER, REERS, SASSE (1994) estudaram o valor prognóstico da ploidia do ADN em ensaio comparativo entre a citometria de fluxo e a citometria de imagem, utilizando a coloração de FEULGEN em cortes histológicos de material em blocos de parafina. Foram utilizadas 221 peças ressecadas de carcinoma de esôfago e estômago. A correlação entre a ploidia de ADN, o “status” modal e os resultados clínicos foram menos fortes nos carcinomas tipo intestinal do cárdia do que naqueles do estômago, devido à metástases linfonodais do carcinoma da junção esôfago-gástrica serem bastante influenciados pelas condições locais da drenagem linfática e tensões mecânicas.

## 2.2 COLORAÇÃO DE FEULGEN

SCHULTE & WITTEKIND (1989) estudaram a padronização da técnica de FEULGEN. Utilizaram quatro fuccinas análogas: a pararosanilina, a rosanilina, a magenta II e a nova fuccina. Foram aplicadas na suas formas puras na técnica de FEULGEN. A absorção total nuclear e o comprimento de onda da absorção máxima foram estudados mediante a microespectrofotometria. A técnica de FEULGEN foi utilizada em tecido hepático e em núcleos de linfócitos do sangue humano na forma de citologia. O nível de cinza dos núcleos tetraplóides hepáticos foram analisados com análise de imagem, já a coloração destas fuccinas puras foram comparadas as presentes no mercado. Concluíram, que entre as fuccinas puras houve igualdade, enquanto as presentes no mercado foram encontradas diferenças principalmente devido contaminação com agentes fluorescentes. Desta forma somente as fuccinas puras estão indicadas para serem utilizadas na reação de FEULGEN.

GIROUD & MOUNTMASSON (1989) estudaram a reação de FEULGEN, baseado na influência dos fixadores. Relatam que a reação de FEULGEN é utilizada para quantificar a citofotometria do ADN e da textura da cromatina nuclear, sendo que os agentes fixadores influenciam na cromatina. Dos nove fixadores utilizados, o REGAUD (composto por formaldeído e dicromato de potássio), foi considerado o melhor.

PELSTRING, HURTUBISE e SWERDLOW (1990) detectaram que análise de ADN através da citometria de fluxo de tumores humanos, utilizando material de arquivo em bloco de parafina, está se tornando método crescente de determinação de ploidia e taxa de atividade proliferativa. Analisaram 16 amígdalas palatinas com hiperplasia e 28 neoplasmas linfóides hematopoiéticos preparando o material de três formas: preparo usando células a fresco, material parafinado fixado com B-5 e material parafinado fixado com formalina. Concluíram que os dados de ploidia e a fase proliferativa originada das preparações fixadas não são equivalentes às informações obtidas de material a fresco. Os tecidos fixados com B-5 apresentaram resultados mais aceitáveis para as análises do que aqueles fixados com formalina.

COPE, ROWE, DELBRIDGE, PHILIPS e FRIEDLANDER (1991) estudaram comparativamente o ADN através da análise de imagem e a citometria de fluxo. O material utilizado era proveniente de blocos de parafina. As análises realizadas pela análise de imagem são melhores, quando utilizado corte histológico espesso para preparação da suspensão que será usada no "cytospin". A técnica de FEULGEN é causa de resultados conflitantes e desta forma deve-se utilizar controles internos, como os fibroblastos, para determinar células diplóides na análise de imagem. Os autores recomendam melhor entendimento dos problemas metodológicos antes de serem utilizados na prática clínica.

SCHULTE (1991) revisou a padronização da reação de FEULGEN para sua utilização na citometria de imagem do ADN. Recomenda cuidados a serem tomados na fixação, na hidrólise ácida, nos componentes do reativo de SHIFT e no material usado nos blocos histológicos. Determina que a reação de FEULGEN deve ser

padronizada, e que seu uso pode ser rotineiro em laboratórios. É método valioso para o estudo nuclear em citometria.

### 2.3 POTENCIALIDADE CLÍNICA DA CITOFOTOMETRIA

JAMES & ATKINSON (1989) estudaram a citometria do ADN para avaliar alterações malignas no esôfago de Barrett. Em cinqüenta e cinco pacientes foram realizada 91 biópsias esofagianas com esôfago de Barrett. Em seis pacientes foram encontrado aneuploidia e quatro destes desenvolveram displasia e adenocarcinoma diagnosticado no acompanhamento da evolução do caso. Em dois destes quatro pacientes já havia aneuploidia mesmo antes da displasia. Na revisão dos casos com aneuploidia, sempre houve associação com anormalidade morfológica, displasia ou carcinoma. Concluem que este método tem importância muito grande na determinação dos pacientes de risco para desenvolver doença maligna.

BRIFFOD, SPYRATOS, HACÈNE, TUBIANA-HULIN, PALLUD, GILLES e ROUËSSÉ (1992) estudaram a quimiossensibilidade do câncer mamário através da citometria de imagem (SAMBA 2005) e de fluxo. Foram estudados 27 pacientes com tumor T3 tratadas com 3 ciclos de quimioterapia pré-operatória. Houve regressão em 12 tumores e 15 permaneceram inalterados. O material de análise foi obtido por punções de agulha fina. As pacientes foram divididas em três grupos, após o primeiro ciclo de quimioterapia. O primeiro com 10 casos, em que não houve mudança do padrão do ciclo celular, havia baixa fase S; o segundo, apresentando 9 casos, mostrou pouco aumento das fases G2M; o terceiro, com oito casos, todos eram não-diplóides com alta fase S e G2M. Após o primeiro ciclo de quimioterapia todos os tumores alteraram seus perfis de ADN, com diminuição G0G1 e aumento das fases S e G2M. Quando comparado a regressão tumoral do 1º grupo e do 2º grupo, houve regressão 1/10 e 3/9, respectivamente. No 3º grupo todos os tumores obtiveram regressão. Na maioria das avaliações houve boa correlação entre os 2 métodos de análise de ADN. A definição do pico de ADN foi melhor para a citometria de fluxo, mas o SAMBA foi melhor para indicar as mudanças das características de

ADN induzidas pela quimioterapia. Concluíram que estes métodos podem auxiliar na seleção de tumores quimiossensíveis.

BOSARI, LEE, WILEY, HEATLEY, HAMILTON e SILVERMAN (1992) estudaram o conteúdo do ADN celular, através da citometria de imagem. Estudo retrospectivo de 213 casos de carcinoma colorretal, material em blocos de parafina, que tiveram seguimento por pelo menos cinco anos. Os histogramas de ADN foram classificados como diplóides, aneuplóides ou tetraplóides. Os tumores diplóides estavam presentes em 29 % dos casos, aneuplóides em 50% e tetraplóides em 21% dos casos. Os tumores aneuplóides foram achados com mais freqüência nos casos mais avançados de doença e nos carcinomas que atingiam o reto. O estágio patológico, a graduação histológica e a ploedia foram relacionados individualmente com a sobrevida e a recorrência. Em pacientes sem metástases regionais ou a distância, pacientes com tumores aneuplóides tiveram estatisticamente prognóstico pior do que os pacientes com tumores diplóides ou tetraplóides. Nos pacientes com metástase regional ou à distância, o conteúdo do ADN não acrescentou informações prognósticas adicionais. Para concluir, citaram que a quantificação do ADN pode ser avaliada pela citometria de imagem de material arquivado e pode prover informações prognósticas valiosas.

DANGOU, SALMON. TORRES, BUDEL, NDIAYE, PASTEELS, VERHEST e KISS (1993) estudaram o tipo de histograma do ADN utilizando 21 casos de retinoblastomas, 11 neuroblastomas, 1 ganglioneuroblastoma e 4 meduloblastoma. A metodologia empregada foi a citometria de imagem pelo SAMBA 2005 em núcleos corados pela técnica de FEULGEN. Os resultados revelam que, com relação ao conteúdo do ADN, os retinoblastomas ( mais aneuplóides ) são bastante diferentes em relação aos neuroblastomas.

SUH & MIN (1993) analisaram o conteúdo do ADN nuclear através da mensuração de citometria de fluxo em 103 pacientes com câncer gástrico, cujo material foi extraído de blocos de parafina. Aneuploidia foi encontrada em 40 casos (38,8%). O índice medido de ADN com tumores aneuplóides foi de 1,45 (variando de

1,13 a 2,37). Não houve associação significativa entre a ploidia e dados clínicos com idade, sexo, localização, tamanho, estágio, crescimento ou tipo histológico do tumor. Entretanto a incidência de aneuploidia foi maior nos graus mais avançados de tumor. Concluíram que a ploidia de ADN pode ser fator prognóstico de muita utilidade nos casos de câncer gástrico avançado.

GASPERIN, BUDEL, PETEIN, PASTEELS e KISS (1994) estudaram o tipo histograma do ADN e o índice de ADN para 508 casos de câncer de mama. Foi utilizada a análise de imagem pelo SAMBA 2005. O material proveio de esfregaços de punções de agulha fina e “imprint” de material de blocos de parafina (utilizando o “cytospin”). Em comparação da graduação de I a III de SCARFF-BLOMM-RICHARDSON (SBR), os resultados revelaram aumento gradativo para a área nuclear e do conteúdo do ADN nos casos de punções por agulha fina e “imprint”, e aumento menos evidente nos materiais provenientes de parafina. Houve alta incidência de tumores diplóides no grau I do SBR e de aneuplóides no grau III do SBR. O sistema mostra-se útil para auxílio na graduação de tumores mamários humanos.

BOWMAN, KANACKI, GARBEROGLIO e CHASE (1995) compararam os métodos: análise de imagem nuclear por computador e a citometria de fluxo. Utilizaram 40 casos de pancreatite crônica, adenocarcinoma pancreático e metástase pancreáticas de adenocarcinoma. Os tecidos foram provenientes de blocos de parafina. O sistema de citometria de fluxo utilizado foi o FACSCAN; e o sistema de análise de imagem foi o CAS 200. Houve concordância nos resultados em 31 dos 40 casos.

## 2.4 A CITOMETRIA E OS TUMORES GÁSTRICOS

KORENAGA, HARAGUCHI, TSUJITANI, OKAMURA, TAMADA, SUGIMACHI e INOKUCHI (1986) avaliaram 244 casos de carcinoma gástrico

submetidos a análise citofotométrica de ADN. Os padrões de distribuição do ADN foram classificados em baixa e alta ploidia. A razão de alta ploidia foi de 55,7% (44/79) no grupo com metástase nos linfonodos e que foi considerado estatisticamente significativo quando comparado a 31,5% (52/165) no grupo negativo para metástase linfonodal, com P menor que 0,01. Assim os tumores com alta ploidia apresentaram maior incidência de metástase linfonodal, enquanto nos tumores de baixa ploidia a incidência foi menor.

DANOVA, RICCARDI, MAZZINI, WILSON, DIONIGI, BRUGNATELLI, FIOCCA, UCCI, JEMOS e ASCARI (1988) analisaram a citometria de fluxo do ADN em amostras obtidas de material de arquivo em bloco de parafina provenientes de biópsia gástrica em nove pacientes com mucosa histologicamente normal e em 42 casos de pacientes portadores de câncer gástrico submetidos a gastrectomia radical. Parâmetros de ploidia e distribuição de células em suas diferentes fases foi avaliada e os resultados foram relacionados com os aspectos histológicos e clínicos destes pacientes. Todas as amostras de mucosa normal mostraram conteúdo de ADN diplóide normal, enquanto a aneuploidia do ADN foi encontrada em 21,4% dos tumores gástricos. A correlação entre aneuploidia e a graduação histológica de malignidade foi histologicamente significativa. A aneuploidia foi encontrada em 36,4% dos tumores bem diferenciados e em 75% dos pouco diferenciado. A percentagem de células em fase S na mucosa gástrica normal foi menor que nos tumores. O parâmetro aneuplóide do ADN foi associado com péssimos prognósticos, tanto nos estágios avançados como precoces de tumores gástricos, enquanto que a atividade proliferativa celular não teve correlação com a sobrevida pós-operatória.

KORENAGA, SAITO, BABA, WATANABE, OKAMURA, MAEHARA e SUGIMACHI (1990) analisaram através da citometria de imagem, a taxa mitótica e o conteúdo de ADN em 37 casos de carcinoma gástrico com o objetivo de identificar a significância biológica das anormalidades de ADN. O tecido das metástases linfonodais regionais também foram analisadas observando-se os mesmos parâmetros. De acordo com a análise de regressão linear, houve correlações estatisticamente significativas das taxas mitóticas com as variantes de ADN, tais

como valores máximos e médios e a frequência de células excedendo complementos cromossômicos tetraplóides ou hexaplóides. Concordaram haver significado estatístico em altos valores de parâmetros de ADN em pacientes com metástases ganglionares comparadas com aquelas sem metástases. Igualmente, altas taxas mitóticas foram observadas nos tumores com doença metastática. A detecção quantitativa das anormalidades de ADN apoiam a informação biológica em prever a ocorrência de metástases em pacientes com câncer gástrico.

TSUCHIYA & HOSHINO (1990) compararam relação entre as características clínicas e os valores de ploidia nuclear em 80 casos de câncer gástrico. Os valores de ploidia do ADN acima de 9 graus C (nonaploidia), nos casos avaliados, foi considerado mais significativo nos casos avançados do que nos precoces. Os valores de ploidia de ADN maior que 12 graus C (duodecaploidia) foi significativo e mais frequentemente observado em casos com metástases linfonodais do que nos casos sem comprometimento dos linfonodos. Os valores elevados de ploidia do ADN de tumores metastáticos para linfonodos foram significativamente maior quando comparado com os casos sem metástase linfonodais. Concluíram que se deve ter sempre em mente que a redução dos níveis de ploidia de ADN nuclear nestes tipos de tumores invasivos não significa necessariamente boa evolução clínica e que a análise de ploidia nuclear é meio bastante efetivo para o diagnóstico do câncer gástrico.

YONEMURA, OYAMA, SUGIYAMA, KAMATA, de ARETXABALA, KIMURA, HOSAKA, YAMAGUCHI, MIWA, MIYAZAKI (1990) analisaram através da citometria de fluxo 493 amostras de carcinomas gástricos emblocados em parafina. Os resultados foram correlacionados com os achados clínico-patológicos e as frações de fase S medidas in vivo pela Bromodeuxiurina marcada (Brd). Dos 493 pacientes, 183 (37%) mostraram diploidia, 225 (46%) evidenciaram aneuploidia simples e 85 (17%) parâmetros multiplóides de ADN. Quando o histograma de ADN e todos os parâmetros clínico-patológicos foram analisados modelo de regressão de Cox, a ploidia de ADN, metástases hepáticas, disseminação peritoneal e status linfonodal emergiram como fatores prognósticos independentes. O risco relativo de

morte foi duas vezes maior nos tumores ADN aneuplóides simples e três vezes maior nos casos ADN multiplóides quando comparados com os ADN diplóides. Os tumores multiplóides mostraram índice maior de Brd marcada quando associados aos casos de disseminação peritoneal e metástase hepática. Concluíram que a diploidia de ADN junto com baixo índice de Brd marcada foi associada com prognóstico mais favorável enquanto que a aneuploidia de ADN e altos índices de Brd marcada foi correlacionada com péssimos prognósticos. Estes resultados indicam que a ploidia do ADN e os índices de Brd marcada são fatores prognósticos de grande utilidade no câncer gástrico.

YONEMURA & MIYAZAKI (1990) analisaram amostras de tumores emblocados em parafina, de 493 pacientes com câncer gástrico, que foram estudados por citometria de fluxo do ADN e atividade proliferativa de 155 casos foi medida pela bromodeuxiuridina marcada, pelo anticorpo monoclonal KI 67 e anticorpo monoclonal anti-P 105. Os resultados foram correlacionados com os achados clínico-patológicos e prognóstico dos pacientes. Dos 493 pacientes, 183 (37%) mostraram diploidia, 225 (46%) aneuploidia e 85 (17%) evidenciaram multiploidia de ADN. O risco relativo de morte foi três vezes maior nos tumores multiplóides do que nos tumores diplóides. Os índices de bromodeuxiuridina marcada também provaram ser fator prognóstico independente. Os tumores multiplóides tiveram taxa de bromodeuxiuridina marcada mediana associada mais freqüentemente com metástases linfonodais e hepáticas. Os resultados indicam que a ploidia do ADN e a atividade proliferativa são fatores prognósticos de utilidade nos pacientes com câncer gástrico.

YONEMURA, SUGIYAMA, KAMATA, HOSAKA, YAMAGUCHI, MIWA, de ARETXABALA, MIYAZAKI (1990) mediram o conteúdo nuclear de ADN em 120 tumores gástricos precoces e os resultados foram correlacionados com os achados histológicos e as frações de fase S medidas in vivo pela Bromodeuxiuridina marcada (Brd). Quarenta e seis casos (38%) foram diplóides e 74 considerados aneuplóides. Nestes, a incidência de invasões da submucosa e vascular e também o envolvimento linfonodal foram significativamente maiores do que nos tumores

diplóides. Notaram ainda que as frações de fase S nos tumores aneuplóides foram significativamente maiores do que naqueles tumores diplóides. Não houve recorrência nos tumores diplóides, enquanto que 21% dos casos com aneuploidia, tiveram recorrência. Estes resultados indicam que o conteúdo de ADN é fator prognóstico interessante a se considerar nos casos de câncer gástrico precoce.

HARAGUCHI, WATANABE, MORIGUCHI, KORENAGA, MAEHARA, OKAMURA, SUGIMACHI (1991) estudaram a ploidia de ADN através da análise citofluorométrica de material de arquivo em blocos de parafina provenientes de 96 pacientes portadores de carcinoma gástrico com invasão da serosa. Aneuploidia foi encontrada em 63 pacientes (66%). A taxa de sobrevida pós-operatória de cinco anos nos casos com malignidade aneuplóide foi significativamente menor (13%) do que aqueles com malignidade diplóide. A análise multivariada de vários fatores clínicos e patológicos mostrou que o tamanho do tumor, metástase linfonodal, invasão vascular e a ploidia de ADN foram fatores significantes e independentes, quando correlacionados com o prognóstico.

HARAGUCHI, KORENAGA, KAKEJI, ORITA, MAEHARA, SUGIMACHI (1991) analisaram o potencial de crescimento tumoral através da ploidia de ADN em 109 pacientes com carcinoma gástrico precoce e 132 com carcinoma gástrico avançado. Os carcinomas gástricos precoces foram classificados pelo potencial de crescimento em tipo mucoso pequeno, tipo superficial, expansivamente penetrante e infiltrativamente penetrante. Os carcinomas avançados foram classificados em funil, colunar ou tipo montanha, sendo que cada um deles foi também dividido em expansivo ou infiltrativo. O conteúdo nuclear de ADN foi medido microespectrofotometricamente e classificado em alta ploidia ou baixa ploidia de acordo com o grau de dispersão do histograma do ADN. O tipo superficial precoce e o tipo funil avançado obtiveram mais comumente baixa ploidia de ADN. Em contraste, o tipo penetrante precoce e o tipo colunar avançado observaram-se mais comumente ploidia de ADN elevada.

SAITO, KORENAGA, HARAGUCHI, MAEHARA e SUGIMACHI (1992) estudaram microespectrofotometricamente a ploidia de ADN e a atividade mitótica em 46 pacientes portadores de câncer gástrico. As medidas do conteúdo do ADN e o índice mitótico foram analisados nas camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa. A frequência de células com valores excedendo a hexaploidia cromossômica (6c) e a análise da contagem mitótica revelou um valor significativamente maior na serosa, quando comparada aos achados na mucosa. Esta tendência não foi evidente nos casos de adenocarcinomas diferenciados, porém foi notada nos casos do tipo indiferenciado. Trinta e sete casos (80%) tiveram os mesmos parâmetros de distribuição de ADN em todas as camadas do estômago. A heterogeneidade de ploidia de ADN foi observada em 9 pacientes (20%). Os carcinomas com heterogeneidade de ploidia de ADN manifestaram incidência significativamente maior de metástases para linfonodos regionais do que aqueles do tipo homogêneo. Caracteristicamente, havia permeação venosa preponderante nos tipos diferenciados e disseminação peritoneal preponderante nos tipos indiferenciados. Esta evidência de heterogeneidade de ADN nos tecidos gástricos tumorais sugerem a possível correlação com o comportamento metastático.

BÖTTGER, GABBERT, STÖCKLE, WELLEK, MENKE, JAUCKUS, GRENZ, HEINTZ e JUNGINGER (1992) analisaram o ADN através de parâmetros histomorfométricos em carcinoma gástrico, utilizando-se do sistema de análise de imagem LEITZ (Modular Image Analysis Computer). O material era proveniente de peças de ressecções curativas. A análise estatística do tipo multivariada regressiva mostrou que o prognóstico depende da condição dos gânglios linfáticos, do estadiamento anatomopatológico, da localização do tumor e do tipo histológico. O conteúdo de ADN, grau de diferenciação celular, o procedimento cirúrgico, as margens de segurança, o tamanho do tumor, o sexo e a idade em nada alteraram o prognóstico.

YONEMURA, MATSUMOTO, NINOMIYA, OHOYAMA, KIMURA, de ALETXABA, SUGIYAMA, KAMATA, KINOSHITA, FUSHIDA (1992) analisaram a heterogeneidade do conteúdo do ADN em 389 amostras obtidas de 65 ressecções

de tumores gástricos. A análise das amostras revelou que haviam 14 tumores homogeneamente diplóides. Seis tumores eram uniformemente ADN aneuplóides e cada bloco tecidual continha o mesmo índice de ADN. Os outros 45 tumores (69%) variaram no conteúdo heterogêneo de ADN. Em 39 dos 45 tumores, havia mistura de amostras diplóides e aneuplóides, e 25 de 39 tumores tinham linhagem de aneuploidia simples. Em 14 dos 39 tumores, havia também uma mistura de amostras diplóides e aneuplóides possuindo duas ou mais linhagens de aneuploidia de ADN. Quando quatro ou menos amostras foram analisadas, somente 50% dos tumores foram diagnosticados como contendo heterogeneidade de ADN. Por outro lado, 78% dos tumores mostraram heterogeneidade de ADN quando 5 ou mais amostras eram analisadas. Os pacientes com tumores mostrando homogeneidade diplóide tiveram sobrevida maior do que aqueles com mistura de linhagens diplóides e aneuplóides. A taxa de sobrevida foi menor para os pacientes portadores de tumores contendo mistura de linhagens diplóides e aneuploidias múltiplas, comparados com aqueles mostrando diploidia homogênea ou mistura de linhagens diplóides ou aneuplóides simples. Segundo os autores os resultados obtidos deste estudo demonstram a importância de amostragens adequadas para acessar o status de ploidia do tumores gástricos para identificar os grupos de pacientes em seus diferentes etapas clínicas e prognósticos.

TSHUSHIMA, NAGORNEY, CHA e REIMAN (1992) determinaram a ploidia nuclear originada de material parafinado através da citometria de fluxo de 277 casos de carcinoma gástrico ressecados cirurgicamente para determinar o relacionamento de vários achados patológicos, a avaliação de ADN e a sobrevida. A preparação das amostras foi feita por modificação da técnica de Hedley corado pelo método de Vindelov. Oitenta e nove (32%) dos carcinomas eram ADN diplóides, 69 (25%) eram ADN tetraplóides e 119 (43%) foram aneuplóides. O parâmetro ADN não-diplóides foram altamente associados com ulceração macroscópica, tumor localizado em região gástrica proximal e estágio avançado de tumor. Os casos com tumores não-diplóides ou aneuplóides tiveram sobrevida significativamente menor que os tumores ADN diplóides. Estes dados suportam o valor prognóstico positivo do estudo do ADN em pacientes com carcinoma gástrico ressecado cirurgicamente.

CARLINI, GAROFALO, RINALDI, D'AGNANO, D'ANGELO, ZUPI, VECCHIONE e SANTORO (1994) estudaram o conteúdo do ADN em câncer gástrico, correlacionado com resultados precoces e tardios, após gastrectomia. Estudaram 59 casos de adenocarcinomas gástricos. O estudo do ADN foi realizado pela citometria de fluxo, sendo que 56% dos tumores foram considerados diplóides e 44% aneuplóides. Alto índice de proliferação foi encontrado em 19 casos e baixo em 16. A aneuploidia ocorreu 65% dos tumores T3-T4; 54% nos N1-N2 e 58% nos estadiamentos III e IV. Nos tumores com alto índice de proliferação (19), 73,7% eram aneuplóides. A sobrevida de 5 anos foi de 94,4% para os tumores diplóides com estadiamento inicial, contra 33,5% nos aneuplóides com câncer avançado. Em qualquer estadiamento da doença, a sobrevida em 5 anos foi 77,4% para os tumores diplóides contra 36% para os aneuplóides.

MIZUNUMA, TSUCHIYA, ANDO, KIKUCHI e ABE (1996) objetivaram ver se existe alguma correlação entre a aneuploidia de ADN, no câncer gástrico que invade a camada muscular própria, e a sobrevida. Para tanto realizaram um estudo retrospectivo com 52 pacientes submetidos à gastrectomia e que tiveram seu "follow-up" de sobrevida avaliado. A mensuração do ADN foi feita através da citometria de fluxo de material anátomo-patológico preservado em bloco de parafina. Vinte e dois casos (42%) apresentaram aneuploidia e 30 (58%) eram diplóides. As metástases linfonodais regionais e a ploidia de ADN tiveram variações prognósticas significativas, porém análise multivariada mostrou que somente a ploidia do ADN foi significativa. Concluíram que a ploidia nuclear do ADN é fator prognóstico independente no câncer gástrico que invade a muscular própria do estômago.

KIM, LEE, KIM YK, BAIK, LEE, KWON e JUNG (1997) estudaram a citometria de fluxo do ADN em blocos parafinados, objetivando clarificar a significância clínica dos achados citométricos no câncer gástrico precoce. Conduziram o estudo a título de investigar o conteúdo do ADN das células tumorais e os índices prognósticos conhecidos no câncer gástrico precoce. A análise do ADN pela citometria de fluxo foi realizada em material parafinado proveniente de 107

casos de câncer gástrico precoce, utilizando o aparelho FACScan. Na construção do histograma, 30.000 células foram escaneadas para avaliação dos resultados. Obtiveram o parâmetro diplóide em 80 (75%) casos, enquanto que a aneuploidia foi vista em 27 (25%) dos casos. A aneuploidia foi mais freqüentemente detectada em tumores com envolvimento submucoso (32,7%) e linfonodos metásticos (30,8%) do que nos grupos em que o tumor restringia-se à mucosa (17,3%) e linfonodos negativos (24,5%), porém as diferenças não foram significativas. A freqüência de aneuploidia não foi afetada pelo tipo histológico ou classificação morfológica. Por outro lado, a alta atividade proliferativa foi correlacionada com a invasão da submucosa e as metástases linfonodais. Concluíram que a agressividade tumoral não é diretamente relacionada com a aneuploidia de ADN, mas a atividade proliferativa é responsável pela natureza agressiva dos tumores gástricos precoces.

ENCHEV & RIGAUT (1997) avaliaram as variações morfométricas celulares e nucleares e o ADN quantitativo em biópsias cirúrgicas provenientes de várias lesões gástricas: gastrite, úlcera crônica, adenomas, câncer gástrico primário e suas metástases linfonodais correspondentes. O material parafinado foi estudado através de citofotometria estática, cariometria (medida dos eixos maiores e menores do perfil nuclear elíptico utilizando micrômetro graduado) e as medidas do perfil celular. Linfócitos teciduais foram usados como controle diplóide da avaliação do ADN. Um aumento tanto nas dimensões celulares e nucleares, como no conteúdo do ADN foi notado em todos os tecidos patológicos quando comparados com a mucosa gástrica normal. Os maiores valores foram encontrados nos carcinomas gástricos. Um aumento progressivo dos parâmetros de dimensões celulares e nucleares e do conteúdo do ADN foi observado em tecidos tanto normais como cancerígenos. Neste estudo as metástases linfonodais tiveram as dimensões nucleares menores do que os tecidos portadores de câncer primário.

ENCHEV (1998) avaliou a taxa de ADN nuclear e as variações morfométricas em várias citologias mamárias e materiais parafinados de lesões gástricas e mamárias. Para tanto utilizou o método de SWIFT E RASCH para absorção citofotométrica (Optom-MPM1). Concluiu que pacientes com processos

hiperplásicos que tinham taxas de conteúdo nuclear de ADN anormalmente altas, com populações de células aneuplóides e aumento das medidas morfométricas devem ser muito cuidadosa e precisamente avaliados, por serem as lesões hiperplásicas potencialmente malignas com alto risco de desenvolvimento de câncer no futuro.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

---

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado no Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC) em convênio com o Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Universidade Federal do Paraná.

Aplicou-se na presente tese as Normas para a Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (1994), as normas para referências bibliográficas (NBR-6023) e abreviaturas de títulos e periódicos (NBR-6032) da Associação Brasileira de Normas Técnicas de 1989 e as normas para apresentação gráfica de dados: tabelas, do Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social – IPARDES, do Governo do Estado do Paraná, *Nomina Anatomica* de 1987 e *Nomina Histologica* de 1975.

#### 3.1 AMOSTRA

O material de estudo foi constituído por 28 casos de tumores malignos de estômago, sendo 12 da grande curvatura gástrica e 16 da pequena, fixados em formalina e arquivados em blocos de parafina. Este material é proveniente do arquivo do Serviço de Anatomia-Patológica do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, proveniente de pacientes submetidos à ressecções gástricas no período de 1992 a 1998 nos Serviços de Cirurgia Geral e de Oncologia deste Hospital.

#### 3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL DESTINADO À ANÁLISE HISTO-PATOLÓGICA

Utilizaram-se 80 blocos de parafina de 68 casos de carcinoma gástrico da pequena e grande curvaturas, com prévio conhecimento de malignidade, localização, tipo histológico através das informações do arquivo e confirmadas através de nova análise do ponto de vista histo-patológico, com o preparo de lamínas coradas com hematoxilina-eosina.

### 3.2.1 Preparo do material histo-patológico

Cada bloco de parafina foi submetido à microtomia obtendo-se um fragmento histológico de 5 micra. As lâminas montadas com os fragmentos foram desparafinadas em banhos de xilol e hidratadas em banhos de soluções com teores alcoólicos decrescentes até serem submetidas a banhos com água. Utilizou-se para a análise microscópica a coloração da hematoxilina-eosina.

As lâminas foram entregues a três patologistas, sem que eles tivessem conhecimento prévio do diagnóstico dado aquele determinado caso, à sua época, bem como não tomaram conhecimento do resultado histo-patológico que seus pares haviam dado à cada lâmina. Nesta etapa o objetivo era definir o diagnóstico histo-patológico dos carcinomas gástricos do ponto de vista histológico, quanto ao padrão intestinal ou difuso e quanto ao grau de diferenciação. Também foi analisada a quantidade de tecido maligno em cada caso, sendo informado apenas a porcentagem de tecido tumoral na lâmina.

### 3.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL DESTINADO À ANÁLISE CITOFOTOMÉTRICA

Após análise histo-patológica foram escolhidos vinte e oito blocos de parafina da grande e da pequena curvaturas baseando-se na quantidade de tecido tumoral em cada corte histológico, os demais apresentavam pouca quantidade de tecido tumoral e não foram aproveitados no trabalho.

Foram realizados cortes histológicos em cada bloco de parafina que continha o espécime de tecido, com espessura de 60 micra e encaminhados para análise citofotométrica.

Para o processamento citofotométrico, foi necessário obter a separação dos núcleos dos outros elementos celulares nos cortes histológicos. Este processo inicia-se com a desparafinização do corte de 60 micra com três banhos de imersão em xileno, seguida da reidratação do corte histológico com banhos sucessivos de etanol, em concentrações decrescentes (100%, 95%, 70% e 50%), por 10 minutos, em cada uma delas. Em seguida, colocou-se os cortes em banhos de água destilada. Ao término deste procedimento, formou-se um sobrenadante, que foi aspirado e filtrado com gase e depositado em um recipiente plástico. Em cada uma

das etapas de desparafinização o corte de 60 micra foi centrifugado por 10 minutos e aspirado o sobrenadante com pipeta. Induziu-se a digestão celular acrescentando-se solução de pronase a 0,05%. Finalmente, realizou-se a centrifugação do sobrenadante que foi filtrado utilizando gaze dobrada e obteve-se um concentrado de núcleos no fundo do recipiente. Os núcleos celulares foram transferidos, para lâminas de vidro, e submetidos à coloração pelo método de FEULGEN (LARSIMONT, KISS, De LAUNOIT e MELAMED, 1990). Para cada tumor foram analisados e computados, no mínimo, 200 núcleos.

### 3.4 COLORAÇÃO DE FEULGEN

A coloração de FEULGEN possui como corante o reativo de SCHIFF; foi utilizada por ser conhecida como quantitativa e específica do ADN. A descrição dos passos técnicos desta coloração será parcialmente transcrita de trabalho anterior do grupo de estudos do qual faz parte o presente trabalho (anexo 2).

### 3.5 ORGANIZAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA SAMBA 4000

O sistema SAMBA 4000 é composto por *hardware* capaz de captar imagens microscópica e por *software* com capacidade para interpretar e analisar matematicamente as imagens por ele captadas.

#### 3.5.1 Equipamentos componentes

O sistema SAMBA 4000 – *Systeme d'analyse microscopique à balayage automatique* ( Sistema de Análise Microscópica de Busca Automática ), fabricado por Alcatel ( Grenoble/França ), teve sua instalação feita no Instituto de Pesquisas Médicas –IPEM em 1996. O *hardware* é composto por microscópio, videocâmera, microcomputador e impressora.

O microscópio utilizado foi o tipo “ZEISS – AXIOSKOP” , de fabricação alemã. O fluxo luminoso, oriundo da lâmpada de xenon, é controlado por um potenciômetro capaz de avaliar com precisão a quantidade de luz; ele atravessa em seguida o condensador, a lâmina e a objetiva. Em seguida é separado em duas partes: a via destinada a permitir a observação visual por meio das oculares e a via

de captação de imagem por meio da câmera, que vai compor a imagem no monitor do computador (figuras 1 e 2).

A captura das imagens foi feita por meio de uma câmera colorida do tipo SONY DXC-970MD 3CCD (Japão), capaz de padronizar as cores verde, azul e vermelha (sistema RGB - "red, green, blue" ), de forma que trabalhe com o mesmo nível de captação que foi determinado. A imagem captada por fotodiodos foi transformada em pontos de imagem (*pixels*), com área equivalente a  $0.16\mu\text{m}^2$  por ponto-imagem e enviada ao computador.

O microcomputador foi tipo PENTIUM 133 MHz, com 16 Mb RAM e disco rígido de 1,2 gigabytes.

Figura 1 - Visão do equipamento de citometria de imagem instalado no IPEM: a) impressora; b) microscópio; c) microcomputador com software e d) monitor auxiliar.

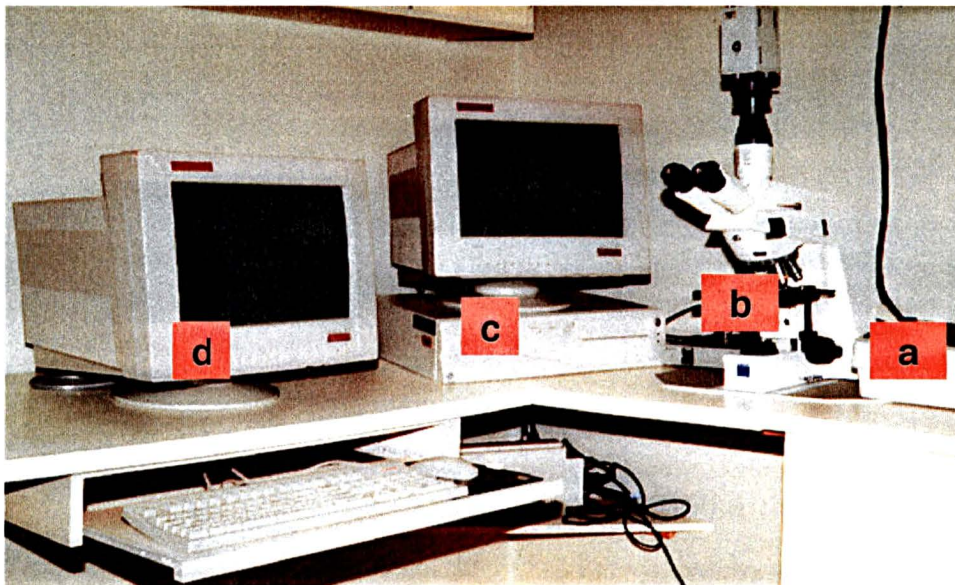
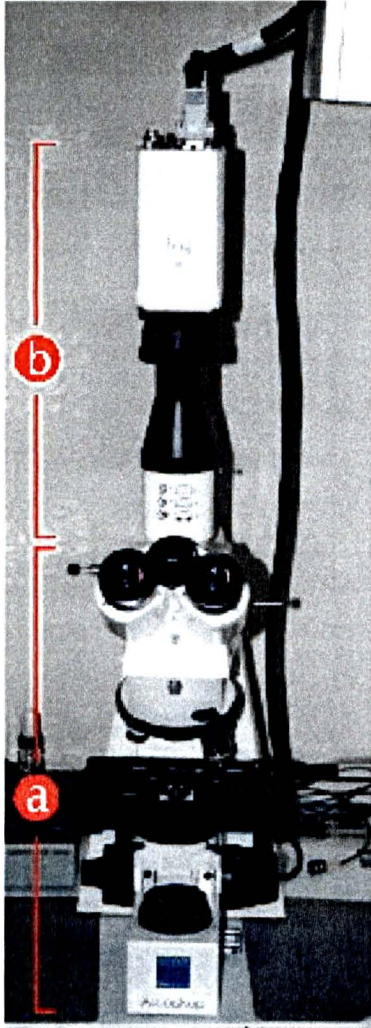


Figura 2 - Detalhe com os elementos referentes à captura da imagem: a) microscópio e b) videocâmera.



### 3.5.2 Programa Computacional (*software*)

A finalidade é transformar as imagens do ADN celular, corados pela técnica de FEULGEN e capturadas pela videocâmera, em matriz numérica. A partir dela calcularam-se parâmetros matemáticos que permitem comparar núcleos entre si (como por exemplo os parâmetros morfonucleares e descritores da taxa de ploidia). Além disto, o programa CSS permite estudo estatístico comparativo monovariado e multivariado das informações obtidas dos diversos núcleos avaliados.

A primeira etapa da análise computadorizada da imagem compreende a transformação da imagem capturada pela câmera de vídeo em imagem numerizada,





sucessivas. A primeira, refere-se ao controle de entrada de luz e inicia-se com a colocação da lâmina no microscópio, a conferência da posição centrada do diafragma, bem como do condensador, com objetiva em aumento de 10x. A segunda, é realizada com objetiva de aumento 100x, em imersão de óleo de cedro, com núcleo focado. Procura-se um campo vazio para a realização da calibragem da quantidade de luz que atravessa a lâmina, mediante *white balance*; com a retirada da objetiva do eixo, realiza-se o *black balance*. Nesta etapa o *software* do sistema SAMBA 4000 realiza a leitura gráfica das cores verde, azul e vermelha, a qual deve coincidir com o padrão pré-estabelecido. A terceira calibragem é realizada no primeiro campo estudado, considerando-se o contraste dos núcleos em relação ao fundo.

A lâmina foi estudada seguindo-se a metodologia descrita por BRUGAL & CHASSERY (1977), que consiste no rastreamento dos campos visuais segundo o princípio da barra grega. Através desta padronização cada lâmina foi avaliada estudando-se de 20 a 40 linhas até que fossem estudados 200 núcleos em média, sendo que em cada campo de 2 a 3 núcleos foram analisados. Cada núcleo foi identificado individualmente e suas características captadas pelo sistema, assim o tempo de leitura de cada lâmina foi em média de 60 minutos. Nesta metodologia é muito importante a qualidade dos núcleos escolhidos pelo observador, núcleos fragmentados, sobrepostos, bem como artefatos pigmentares foram excluídos da leitura e os núcleos unidos foram separados por artifícios técnicos que o próprio programa oferece.

No término da captação das imagens de cada amostra tumoral, o *software* do sistema SAMBA 4000 edita uma tabela de "*quick statistics*", listando o número de núcleos analisados, os valores médios e desvio padrão, bem como o intervalo de confiança de 5% para cada um dos parâmetros morfonucleares (anexo 1).

### 3.7 PARÂMETROS MATEMÁTICOS CALCULADOS PELO COMPUTADOR

A base para a identificação e cálculo destes parâmetros matemáticos é a densidade óptica de cada ponto de imagem. A densidade óptica está diretamente relacionada a quantidade de ADN que absorveu o corante neste ponto.

O programa computacional calculou a partir da imagem numérica nuclear individual, quinze parâmetros, determinando de maneira numérica as diferenças entre os núcleos estudados comparativamente.

Os resultados foram identificados segundo seu grau de significância em função da probabilidade “p”, da seguinte maneira:

- a) Não significante =  $p \geq 0,05$
- b) Significante =  $0,01 \leq p < 0,05$
- c) Muito significante =  $0,001 \leq p < 0,01$
- d) Extremamente significante =  $p < 0,001$

### 3.7.1 Parâmetro morfométrico - área nuclear

O parâmetro morfométrico permite calcular a área do núcleo. Esta área corresponde à superfície (em número de pontos-imagem = pixel) ocupado pela sua projeção sobre a lâmina histológica.

### 3.7.2 Parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular

Estes parâmetros são em número de cinco e estão agrupados em função da densidade óptica dos núcleos. Abaixo descrevem-se os parâmetros 2, 4, 5 e 6. O parâmetro 3, que refere-se à média da densidade óptica, não será descrito porque não foi utilizado neste trabalho.

Parâmetro 2 (Densidade óptica integrada ): o valor somado de todas as densidades ópticas de cada ponto de imagem do núcleo. Representa a quantidade total do ADN nuclear. Pode ser expresso em número absoluto ou em histograma.

Parâmetro 4 (Variância das densidades ópticas): estabelece a heterogenicidade da distribuição dos diferentes graus de condensação da cromatina.

Parâmetro 5 (Coeficiente de assimetria ou Índice de “Skewness”): traduz o grau de descondensação da cromatina durante o ciclo celular. Pode ser expresso como coeficiente positivo ou negativo.

Parâmetro 6 (Coeficiente de curtose): auxilia a determinação do aplainamento do histograma; mede a altura e a largura do pico maior do histograma. O seu valor aumenta quanto maior a altura do pico do histograma e a largura da base traduzem o aumento da homogeneidade nos graus de condensação da cromatina.

### 3.7.3 Parâmetros ligados à textura da cromatina nuclear

Os parâmetros relacionados a textura da cromatina, são calculados com base na matriz de comprimento da secção e da matriz de coocorrência dos níveis de densidade óptica. Têm por objetivo caracterizar a organização das manchas dentro do núcleo considerando apenas níveis de cinza acima de 170. Estes parâmetros pertencem a grupos distintos:

a) Derivados dos comprimentos de secção da cromatina:

Parâmetro 7 (Frequência de curtas secções da cromatina): estabelece a frequência das curtas secções de pontos de imagem com alta densidade na cromatina nuclear.

Parâmetro 8 (Frequência de longas secções da cromatina): revela a presença de texturas grosseiras de cromatina; mede a frequência de grandes agrupamentos da cromatina na imagem nuclear.

Parâmetro 9 (Distribuição dos níveis de cinza): é uma medida da não-uniformidade da distribuição dos níveis de cinza da imagem nuclear.

Parâmetro 10 (Distribuição dos comprimentos de secção): é uma medida da não-uniformidade da distribuição dos níveis de cinza da imagem nuclear, independente de seu nível de intensidade.

Parâmetro 11 (Porcentagem dos comprimentos de secção): mede o número de secções por unidade de área, isto é, quanto mais longa forem as secções menor o seu número. Este parâmetro é correlacionado ao SRL a ao LRL.

b) Derivados das matrizes de coocorrência, que estão relacionadas à probabilidade de repetição de determinados padrões de distribuição dos pontos de imagem.

Parâmetro 12 (Média local): este parâmetro mede o nível da densidade média do núcleo, estabelecendo o grau global da condensação da cromatina.

Parâmetro 13 (Segundo momento ou energia): é a heterogenicidade da distribuição dos pares de pontos da matriz.

Parâmetro 14 (Variância dos coeficientes da matriz de coocorrência): traduz a heterogenicidade da distribuição dos pares de pontos da matriz.

Parâmetro 15 (Contraste): estabelece o contraste entre as regiões nucleares com diferentes valores de intensidade.

### 3.8 ESTUDO ESTATÍSTICO

A análise individual dos parâmetros estabelecidos pelo SAMBA 4000, em cada amostra, dá a análise monovariada. Analisando os parâmetros todos juntos tem-se o estudo multivariado. Para a realização do estudo estatístico, utilizou-se o *software* do sistema SAMBA 4000 e o *software* "STATISTICA 3.1". Neste trabalho utilizou-se o cálculo multivariado apenas porque no cálculo monovariado os valores não foram significativos. Portanto, desta forma descreve-se apenas o estudo multivariado.

#### 3.8.1 Estudo estatístico multivariado

Baseou-se no cálculo das funções canônicas, permitindo visualizar no plano fatorial (bidimensional) os resultados obtidos em 15 vetores pela análise discriminante (informações obtidas pelo estudo de 15 parâmetros morfonucleares, em conjunto). Este cálculo foi realizado pelo *software* "CLUSTER" do sistema SAMBA 4000. Graficamente convencionou-se chamar o eixo X de primeira função (mais discriminante) e o eixo Y de segunda função. Através do *software* "DISCRI", do sistema SAMBA 4000, classificaram-se os parâmetros em ordem de significância em relação à capacidade discriminadora das amostras tumorais.

Após a caracterização morfonuclear de todas as amostras e as suas projeções respectivas no eixo de coordenadas X e Y, submeteram-se os resultados de filtragem matemática (que é a utilização de classificadores matemáticos que são utilizados para aceitar ou rejeitar dados matemáticos relativos às imagens) para a obtenção de núcleos típicos representativos para as amostras tumorais. Os núcleos foram armazenados em arquivo próprio e denominados de banco de dados

morfonucleares. Com base nesta filtragem matemática, no banco de dados e partindo das informações iniciais relativas aos dados não filtrados, definiu-se a população de núcleos semelhantes, comuns às amostras tumorais.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 AMOSTRA

A localização anatômica dos carcinomas gástricos foi obtida a partir do histórico de cada caso arquivado no serviço de anatomia-patológica, sendo a confirmação do tipo histológico feita por três patologistas, sem que soubesse do diagnóstico do outro, e todos os tumores foram adenocarcinomas.

Tabela 1 – Localização anatômica dos carcinomas gástricos.

N	Identificação	Localização
1	95-3612	PC
2	97-4833	PC
3	96-069	GC
4	97-4857	GC
5	97-2432	PC
6	96-328	GC
7	96-4853	GC
8	95-1809	PC
9	96-3318	PC
10	97-4445	PC
11	97-4100	PC
12	96-1133	PC
13	95-1346	PC
14	93-393	PC
15	95-1889	PC
16	94-3485	GC
17	95-3585	GC
18	97-2758	GC
19	97-3362	PC
20	97-4281	PC
21	97-4670	PC
22	96-2440	GC
23	95-2966	PC
24	97-4984	GC
25	98-226	GC
26	96-3414	PC
27	94-2868	GC
28	98-1043	GC

N = número do caso do carcinoma gástrico

GC = Grande Curvatura PC = Pequena Curvatura

## 4.2 ANÁLISE MULTIVARIADA

A análise multivariada dos 28 casos de carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas, baseando-se no cálculo das funções canônicas, permitiu obter informações de 15 parâmetros morfonucleares em conjunto.

### 4.2.1 Transformação canônica dos dados e geração do banco de dados morfonucleares

Foram utilizados para a transformação canônica os dados obtidos a partir de 5.816 núcleos dos 28 casos. Todos estes núcleos foram projetados num gráfico de coordenadas X e Y, obtendo-se distribuição espacial das populações nucleares. A seguir projetou-se a linha discriminante de Fisher sobre a população nuclear, permitindo-se a realização da primeira filtragem matemática e da primeira função canônica. Esta primeira filtragem matemática foi feita automaticamente pelo *software*. Portanto, a população nuclear restante foi formada por 2.702 núcleos, sendo, 1.474 da amostra referente a pequena curvatura e 1.228 da grande curvatura gástricas. Como a população nuclear ainda é volumosa e com superposição dos núcleos, repetiu-se o procedimento de filtragem matemática e finalmente obteve-se uma população de 1.656 núcleos, sendo, 882 núcleos das amostras da pequena curvatura e 774 da grande curvatura. Estes resultados podem ser vistos nos gráficos 1, 2 e 3

Gráfico 1 – Análise estatística multivariada, com transformação canônica que representa os núcleos das amostras da pequena curvatura (azuis) e grande curvatura (verde), analisando os 15 parâmetros. Nesta representação gráfica tem-se aproximadamente 2.702 núcleos e 95% deles estão dentro das elipses.

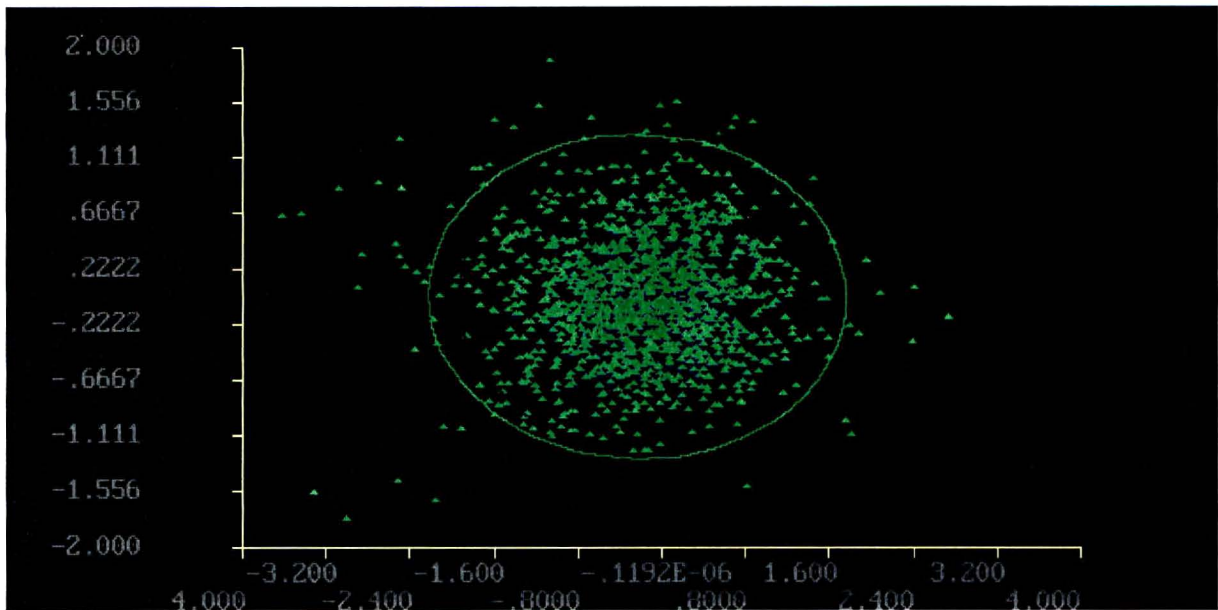


Gráfico 2 – Projeção da linha discriminante de Fisher sobre a população nuclear da função canônica representada no gráfico 1.

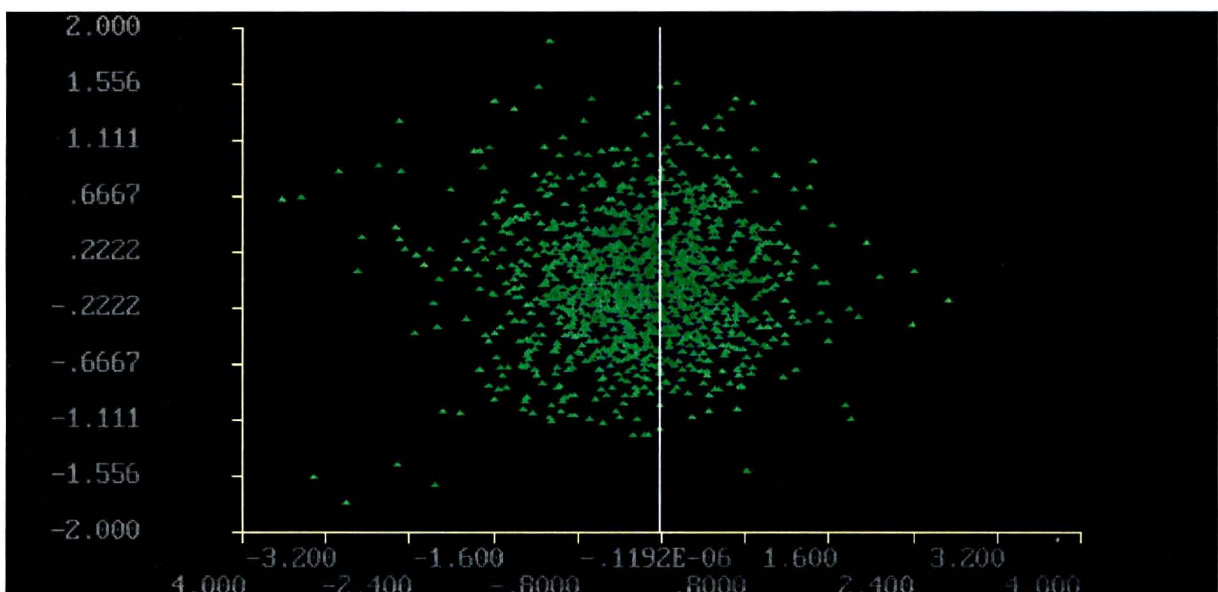
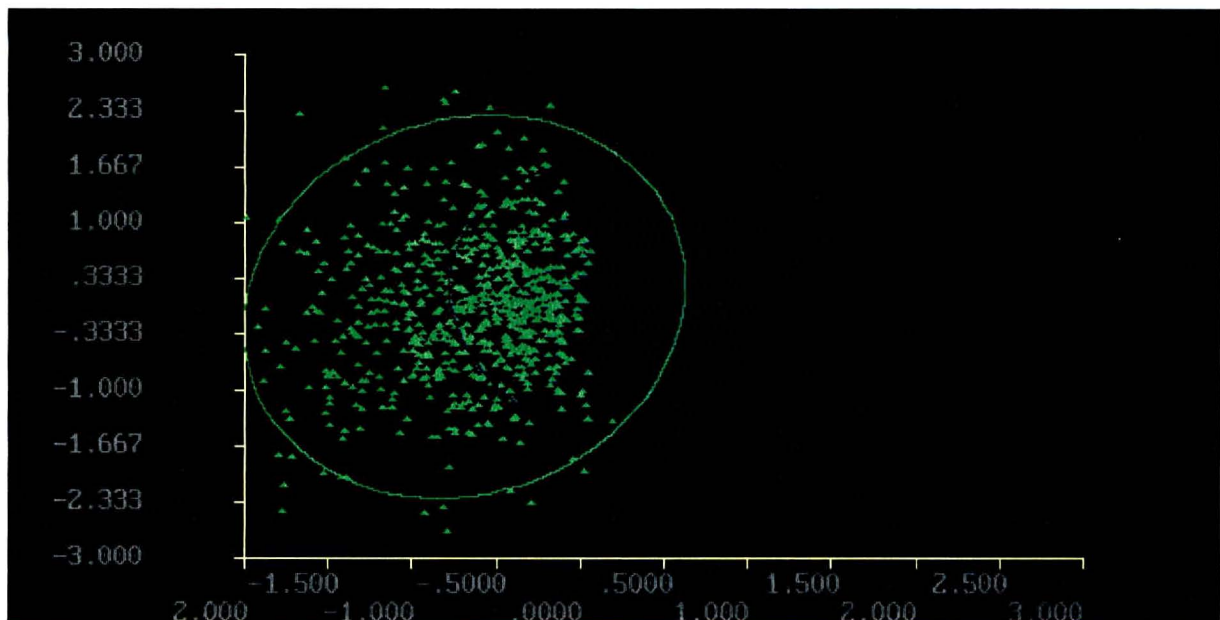


Gráfico 3 – Representação gráfica da população nuclear derivada da segunda filtragem matemática.



### 4.3 PARÂMETROS MATEMÁTICOS CALCULADOS PELO COMPUTADOR

Foram estudados os quinze parâmetros matemáticos, mas somente serão mencionados os resultados dos parâmetros, cujo valor de “p” do estudo estatístico F de Fischer foi significativo, muito significativo ou extremamente significativo.

#### 4.3.1 Parâmetro morfométrico - área nuclear

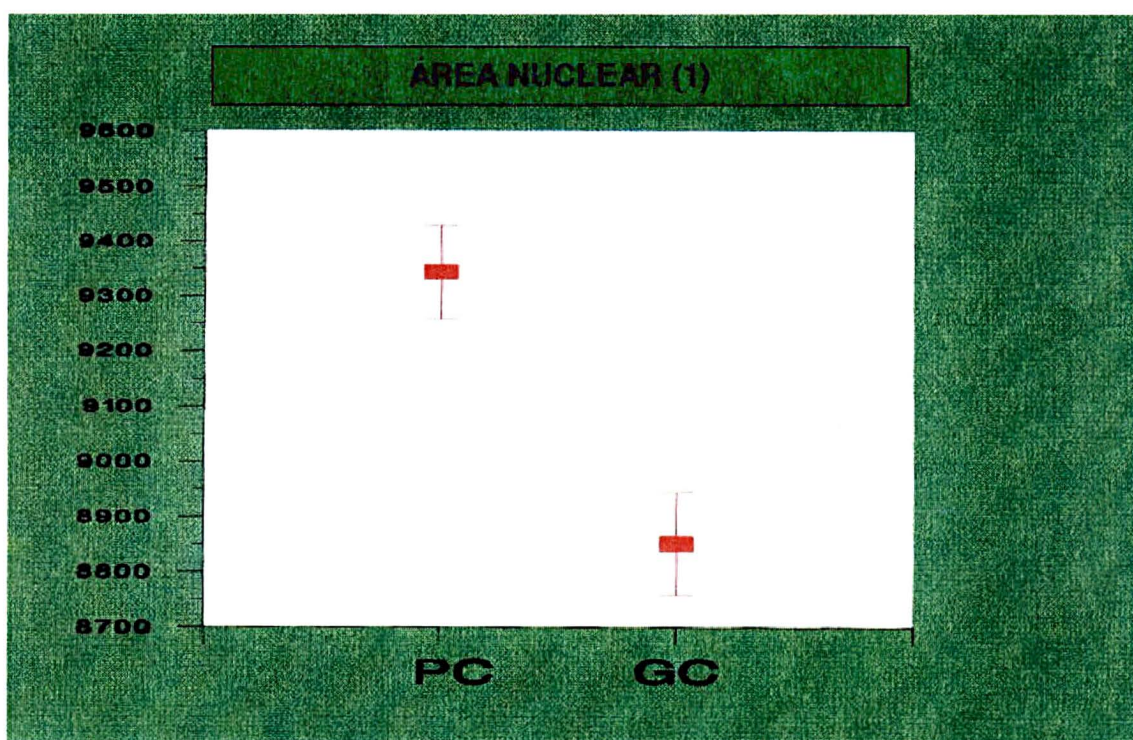
A média do cálculo da área nuclear foi 9.343 pontos de imagem nos casos de carcinoma de pequena curvatura gástrica e de 8.850 pontos de imagem nos casos de carcinoma da grande curvatura. Estes resultados foram obtidos quando juntaram-se todos os núcleos dos tumores da pequena e grande curvaturas do estômago. Portanto, os núcleos do carcinoma dos tumores da pequena curvatura apresentam área nuclear maior em relação aos tumores da grande curvatura, sendo esta diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ). Os resultados das médias e do erro padrão da média, estão na tabela 2.

Tabela 2 - Valores da média e do erro padrão da média da área nuclear dos casos de carcinoma gástrico da pequena e grande curvaturas do estômago

Localização Anatômica do Tumor Gástrico	Média da Área Nuclear	Erro Padrão da Média
Pequena Curvatura	9.343	2.577
Grande Curvatura	8.850	2.543

O gráfico 4 ilustra a comparação do valor da média da área nuclear dos casos de carcinoma gástrico da pequena e grande curvaturas, com os seus respectivos erros padrões. Sendo que na coordenada X estão expressos os valores dos pontos de imagem da área nuclear.

Gráfico 4 – Média +/- erro padrão da média da área nuclear dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.



#### 4.3.2 Parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular

Estes parâmetros são em número de cinco, os parâmetros 5 e 6 que são variância das densidades ópticas e coeficiente de curtose respectivamente não

apresentaram valores significativos, portanto, não serão aqui mostrados os seus resultados.

O parâmetro densidade óptica integrada apresentou 2.545 unidades arbitrárias (u.a) como média da densidade óptica integrada de todos os núcleos analisados nos casos dos tumores da pequena curvatura e com erro padrão de 1.214 (u.a.). Nos carcinomas da grande curvatura a média da densidade óptica integrada de todos os núcleos analisados foi de 2.242 (u.a.) com erro padrão de 778 (u.a.). Portanto, a diferença entre o resultado da média da densidade óptica integrada dos núcleos dos tumores da pequena e grande curvaturas do estômago foi extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) sendo a densidade óptica integrada maior para os tumores da pequena curvatura.

O parâmetro coeficiente de assimetria ou Índice de "Skewness" foi de 3,12 unidades arbitrárias (u.a.) para os tumores da pequena curvatura, com erro padrão de 1,85 (u.a.), sendo que nos casos dos tumores da grande curvatura o cálculo da média do coeficiente de assimetria de todos os núcleos foi de 2,53 (u.a.), com erro padrão de 2,47 (u.a.). Desta forma, este parâmetro também apresentou diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) quando compararam-se os resultados dos casos da pequena e grande curvatura do estômago, sendo que o valor da média foi maior nos casos da pequena curvatura para o parâmetro coeficiente de assimetria.

Os resultados das médias da densidade óptica integrada, do coeficiente de assimetria e dos seus respectivos erros padrões, podem ser vistos na tabela 3.

Tabela 3 – Valores da média do parâmetro densidade óptica integrada, do coeficiente de assimetria e dos respectivos erros padrões dos casos de carcinoma gástrico da pequena e grande curvaturas

Parâmetro	Localização Anatômica	Média	Erro Padrão da Média
2	P. C.	2.545	1.214
	G. C.	2.242	778
4	P. C.	3,12	1,85
	G. C.	2,53	2,47

P.C. = pequena curvatura; G.C. = grande curvatura

Os gráficos 5 e 6 mostram os valores das médias dos parâmetros densidade óptica integrada e coeficiente de assimetria com os respectivos erros padrões da média, nos carcinomas da pequena e grande curvatura do estômago.

Nota-se que em ambos os parâmetros analisados a pequena curvatura apresenta os valores expressos em unidades arbitrárias superiores quando comparados aos da grande curvatura.

Gráfico 5 – Média +/- erro padrão da média do parâmetro densidade óptica integrada dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.

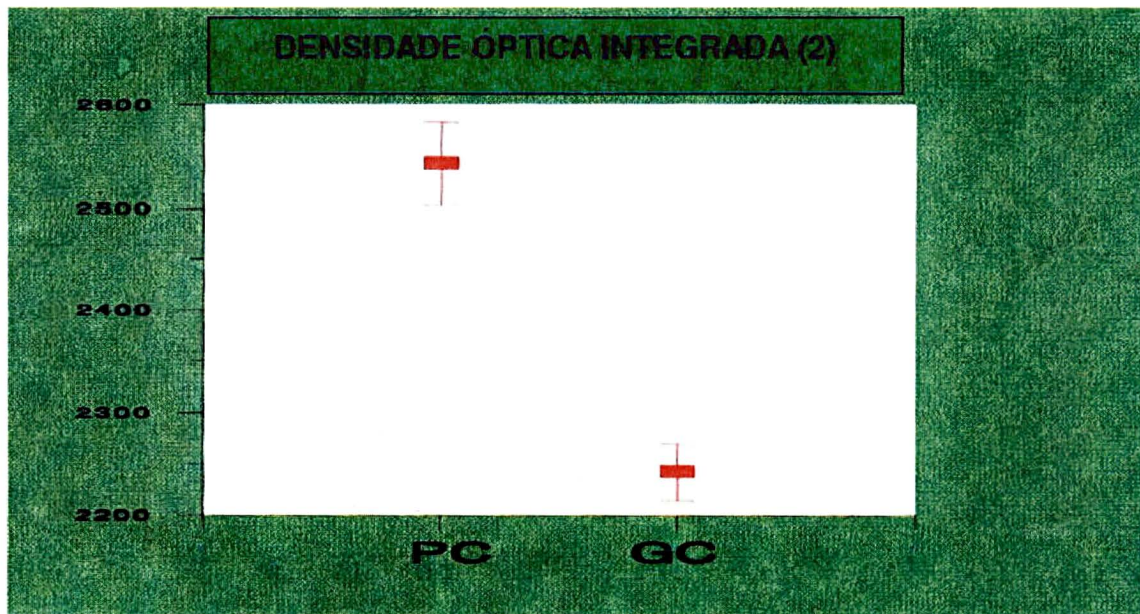
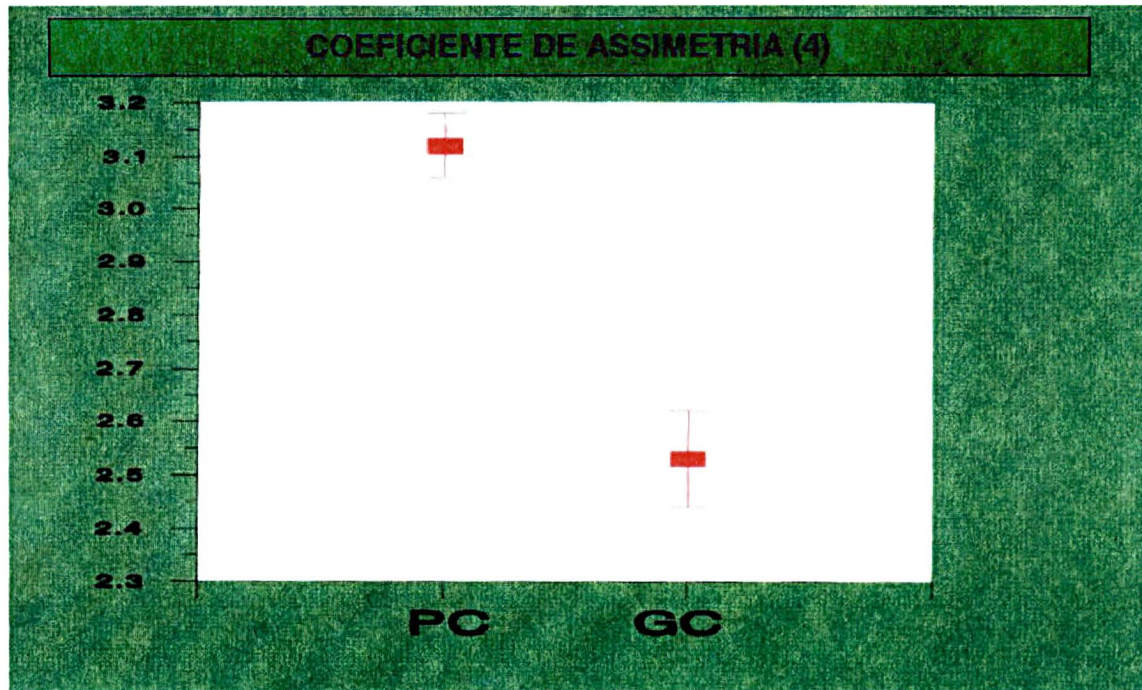


Gráfico 6 – Média +/- erro padrão da média do parâmetro coeficiente de assimetria ou Índice de “Skewness” dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.



#### 4.3.3 Parâmetros ligados à textura da cromatina nuclear

Estes parâmetros estão divididos em dois grupos distintos, os parâmetros: frequência de curtas secções da cromatina (7), frequência de longas secções de cromatina (8), distribuição dos níveis de cinza (9), distribuição dos comprimentos de secção (10) e porcentagem dos comprimentos de secção (11) são derivados do comprimento de secção da cromatina. Como os resultados destes parâmetros não apresentaram valores significativos, não serão mencionados neste capítulo.

Os parâmetros: média local (12), segundo momento ou energia (13), variância dos coeficientes (14) e contraste (15) são derivados das matrizes de coocorrência. Destes parâmetros, apenas o parâmetro (14) apresentou valor não significativo, portanto não será mencionado nesta etapa; os demais serão descritos por apresentarem valores significativos.

A média local das matrizes de coocorrência foi de 153 unidades arbitrárias (u.a.) e 160 (u.a.) para a pequena e grande curvaturas respectivamente; o segundo momento ou energia das matrizes de coocorrência apresentou média de 11,20 para

a pequena curvatura 10,04 u.a. para a grande curvatura enquanto no parâmetro contraste das matrizes de coocorrência observou-se média de 566 u.a. e 485 u.a. para pequena e grande curvaturas respectivamente.

Os resultados das médias dos parâmetros relacionados às matrizes de coocorrência assim como o erro padrão de cada uma delas, podem ser visualizados na tabela 4. Nota-se que, no parâmetro média local das matrizes de coocorrência (12), quando comparou-se os resultados da análise dos núcleos dos tumores da pequena e grande curvatura do estômago teve-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) sendo que a média local das matrizes de coocorrência foi maior para os casos de tumores da grande curvatura. Enquanto nos parâmetros segundo momento ou energia (13) e contraste das matrizes de coocorrência (15), quando compararam-se os resultados da pequena e grande curvatura gástricas, obtiveram-se diferenças extremamente significativas ( $p < 0,001$ ), sendo que nos dois parâmetros os valores expressos em unidades arbitrárias é maior nos núcleos da pequena curvatura do estômago.

Tabela 4 – Valores das médias dos parâmetro 12, 13 e 15 e seus respectivos erros padrões dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas

Parâmetro	Localização Anatômica	Média	Erro Padrão da Média
12	P. C.	153	61
	G. C.	160	70
13	P. C.	11,20	6,20
	G. C.	10,04	5,45
15	P. C.	566	360
	G. C.	485	259

P.C. = pequena curvatura; G.C. = grande curvatura

Os gráficos 7, 8 e 9 mostram os valores médios e os erros padrões dos parâmetros média local (12), segundo momento ou energia (13) e contraste (15) todos relacionados às matrizes de coocorrência. Nota-se que os parâmetros relacionados às matrizes de coocorrência podem ser usados para diferenciar os núcleos de tumores da pequena e grande curvatura, porque os resultados apresentam diferenças significativas, que podem ser observados nos gráficos a seguir.

Gráfico 7 – Média +/- erro padrão da média do parâmetro média local das matrizes de coocorrência dos carcinoma gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.

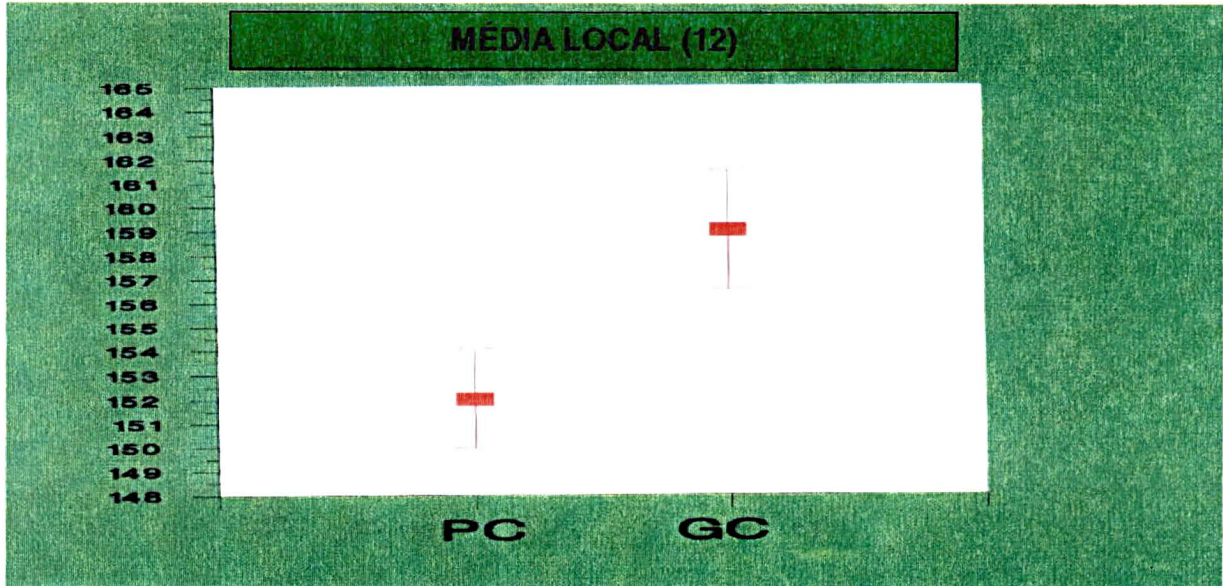


Gráfico 8 – Média +/- erro padrão da média do parâmetro energia ou segundo momento das matrizes de coocorrência dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.

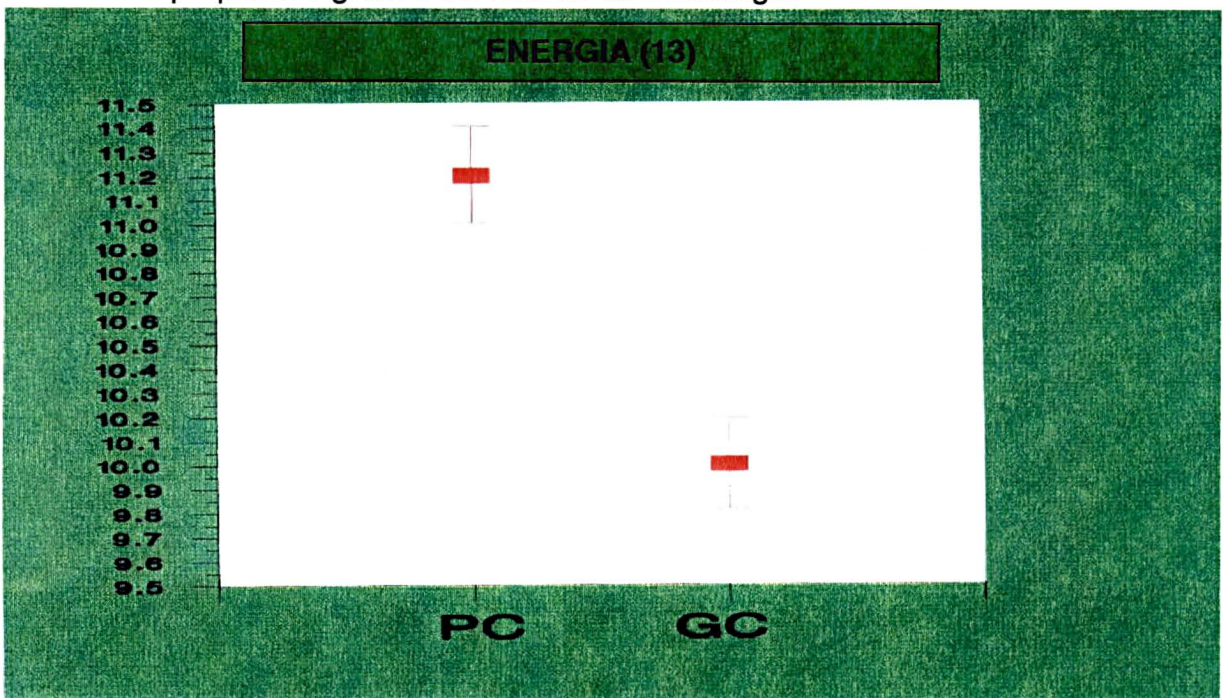
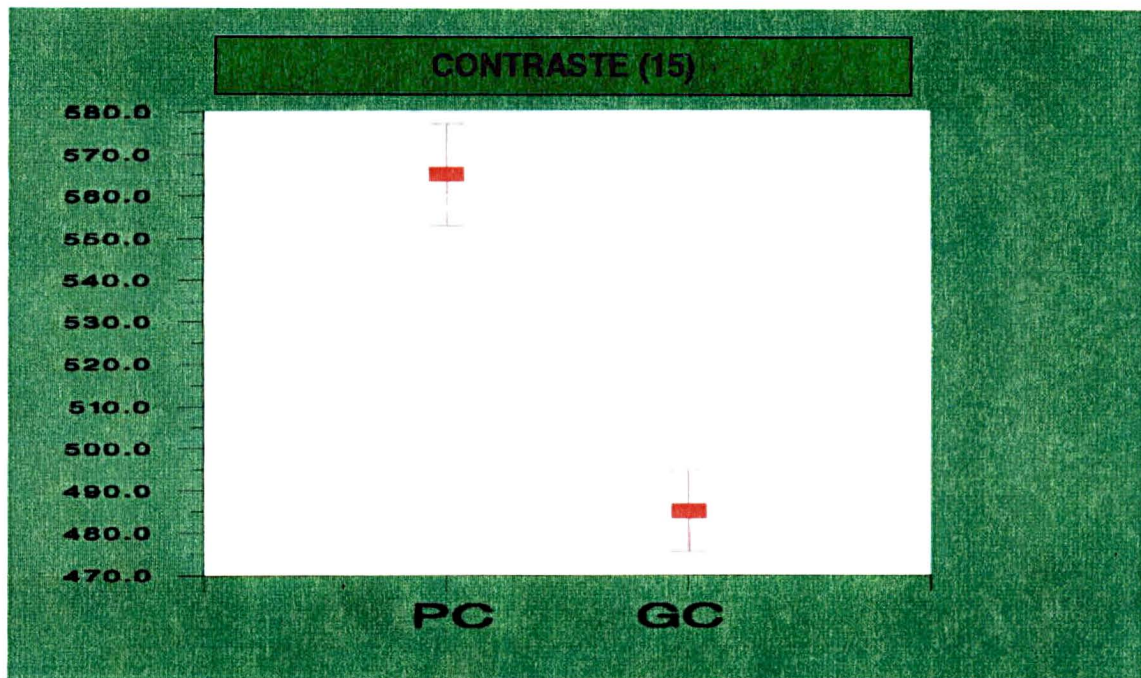


Gráfico 9 – Média +/- erro padrão da média do parâmetro contraste das matrizes de coocorrência dos carcinomas gástricos da pequena e grande curvaturas do estômago.





## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGEM

Os primeiros estudos sobre morfometria celular foram realizados por um cientista alemão JAKOBI (1925). Ele demonstrou que o crescimento celular era acompanhado pelo aumento do volume nuclear, isto acontecia imediatamente antes da divisão celular. Os primeiros pesquisadores a estudar a análise quantitativa celular foram CASPERSON, POLLISTER, LEUCHTENBERGER, MELLORS, BRACHET e LISON, sendo estes dois últimos considerados os pais da histoquímica moderna apud ATKIN (1956), KOSS (1990) E LISON (1953).

A citometria de imagem surgiu com o objetivo de obter resultados mais detalhados quando comparados aos resultados obtidos pela análise da imagem ao olho humano. A imagem da citometria é processada por *software* instalado em *hardware* potente. Desta forma a interpretação passa da mente humana para o computador. Quando este avanço tecnológico é analisado do ponto de vista ético, não se pode esquecer que está-se transferindo a responsabilidade dos resultados a uma máquina e assim não se tem um responsável quando o resultado apresentar erro que possa alterar o tratamento da doença.

Para que se pudesse chegar a situação atual da citometria, várias etapas foram vencidas, como a evolução da microscopia e as técnicas de coloração que possibilitaram melhor estudo das estruturas celulares. FEULGEN E ROSSENBACH (1924), desenvolveram a técnica de coloração do ADN. Como este é um importante marcador tumoral, esta coloração apresentou grande impulso e passou a ser a de escolha em citofotometria das células tumorais.

Observando todas as etapas que esta evolução tecnológica apresentou, talvez a mais importante para a análise computadorizada de imagem, foi a criação da microfilmagem. Esta técnica teve início com trabalhos realizados por VLÉS E CHEVROTON na França (1909).

A teoria da fotometria de imagem foi desenvolvida inicialmente por MERTZ E GRAY (1934) apud BRUGAL (1977), e aplicada por CASPERSON (1936 e 1950). A determinação dos parâmetros morfológicos de uma imagem fundamenta-se numa transformação em dado matemático, desenvolvida por MATHERSON (1969) e SERRA (1971) apud BRUGAL (1977), que levou à possibilidade de estudos de imagem pela câmera de vídeo.

Para diminuir a subjetividade da análise microscópica entre diferentes observadores, diversos sistemas comerciais de análise de imagem por computador foram desenvolvidos, como o sistema de estudo da citofotometria do ADN, SAMBA 4000.

## 5.2 BIOLOGIA TUMORAL

Quando ocorre referência a neoplasias que tem o mesmo significado de tumor deve-se sempre definir, se é maligno ou benigno, porque o tratamento e prognóstico apresentam diferenças significativas, como a capacidade de originar células metastáticas, que é característica apenas dos tumores malignos.

Cada neoplasia apresenta as suas particularidades com relação a capacidade de invasão de tecidos vizinhos, no desenvolvimento de metástase, no crescimento tumoral, na resposta ao tratamento e no prognóstico, mas todas elas tem início em uma única célula maligna, para então iniciar a proliferação celular.

No caso do câncer gástrico, a disseminação pode ocorrer por infiltração direta de órgãos vizinhos, por continuidade e contigüidade ou a distância por células tumorais que se desprendem e são levadas pelas correntes linfática e sangüínea, por embolia celular ou pelo crescimento do tumor dentro dos ductos linfáticos.

Este trabalho procurou encontrar nas características morfológicas dos núcleos do carcinoma gástrico da pequena e grande curvatura do estômago as informações que pudessem identificar cada um deles.

Os resultados mostraram a existência de diferenças significativas confirmando a heterogenicidade entre os núcleos dos carcinomas da pequena e grande curvaturas do estômago.

### 5.3 CÂNCER GÁSTRICO

A incidência do câncer do estômago tem diminuído nas últimas décadas na Europa Ocidental e nos Estados Unidos. Em 1933 era de 19,8 por 100.000 habitantes, e em 1971, 8 por 100.000. Não há explicações epidemiológicas nem estudos carcinogênicos que justifiquem esta queda. Em países como os Estados Unidos, o câncer gástrico está em sexto lugar como causa de morte por câncer naquele país. No Brasil, se excluirmos os cânceres de pele o carcinoma gástrico é a principal causa de morte entre os homens e a quarta causa entre as mulheres. No Japão representa 54% de todos os cânceres do homem e 40% da mulher, e a mortalidade é 5 vezes maior do que nos indivíduos da raça branca dos EUA.

O prognóstico dos pacientes portadores de carcinoma gástrico é determinado por vários fatores, como: localização, tempo de evolução, tipo histológico e outros, sendo o tempo de evolução um dos fatores mais importantes. Assim, nos países aonde a incidência é muito alta como Japão, Chile e Costa Rica, há grande investimento tecnológico para o diagnóstico precoce. Mesmo quando no momento da detecção encontra-se o câncer gástrico em estágio avançado deve-se optar pela ressecção gástrica, porque isto pode proporcionar bom tratamento paliativo na maioria dos pacientes, ou proporcionar melhores resultados nos tratamentos adjuvantes.

Estudos epidemiológicos apontam para os fatores ambientais como causa no surgimento do carcinoma gástrico. Entre os mais freqüentes estão: dieta, classe sócio-econômica baixa, habitação urbana ruim e tipo de solo. Embora os agentes etiológicos não estejam completamente elucidados, há evidências de que pólipos adenomatosos, pólipos vilosos, gastrite crônica atrófica ou atrofia gástrica e gastrite hipertrófica, são referidas como lesões pré-malignas, portanto, aumentam a incidência de câncer gástrico. A localização dos tumores gástricos malignos segue, via de regra, a seguinte distribuição: 39% na pequena curvatura; 12% na grande curvatura; 24% nas paredes anterior e posterior e em 25% dos casos nas demais localizações.

#### 5.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Na obtenção das amostras as informações de cada bloco estavam registradas no laboratório de anatomia-patológica de onde vieram, ou seja, tratava-se de câncer gástrico e a sua localização anatômica definidas em pequena ou grande curvatura. Mesmo assim, para que se evitasse a utilização de outros tipos de tumores, o material foi estudado por três novos patologistas, que confirmaram as informações, ou seja, que o material tratava-se de carcinoma gástrico, que a quantidade de tecido tumoral em cada bloco era suficiente e se poderia ser usado neste trabalho, mas não foi possível confirmar a localização anatômica. Desta forma, confiou-se nas informações de arquivo. A partir desta etapa os blocos receberam a mesmo preparo não apresentando nenhuma variável.

As etapas que foram utilizadas na fixação do material em formalina e para confecção dos blocos de parafina, foram realizadas conforme orientação do laboratório de anatomia-patológica, ou seja, não houve uma padronização específica para este trabalho, desta forma a concentração da formalina e a temperatura da parafina nestas etapas podem ter causado variações no material nuclear das células. Nesta etapa também houve grande perda de material embocado, devido a qualidade ruim para que pudesse ser aproveitado para este estudo. A primeira seleção do material que seria usado neste trabalho, separou 68 casos em 80 blocos de parafina, mas apenas 28 tiveram condições técnicas perfeitas para compor a amostra, ou seja, obteve-se perda de 58,82%. Mesmo levando-se em consideração que o preparo do material em bloco de parafina não foi padronizado, os resultados estatísticos mostram diferenças significativas entre os núcleos do carcinoma da pequena e grande curvatura.

Também ocorreu dificuldade no processo de criação da suspensão, formada exclusivamente pelos núcleos para serem coradas pelo método de Feulgen. Para formação desta suspensão, várias etapas foram vencidas, como descritas no capítulo Material e Método. Algumas dificuldades, surgiram, como a obtenção da pronase, enzima que promove a destruição do material celular que não é núcleo. Esta enzima é importada e necessita de conservação em meio refrigerado, o que dificulta o transporte. Também perdeu-se o primeiro pedido que chegou para o

estudo, por queda da energia elétrica durante o período da noite e quando foi ser usada ela tinha perdido o seu poder de ação. Outra dificuldade foi na obtenção de lâmina preparada com uma camada de substância aderente, lisosima, que promove a fixação do núcleo quando ele é projetado sob pressão. Então, utilizou-se uma alternativa sugerida por patologistas experientes, que era submeter a lâmina a um banho em albumina humana que tinha a função de provocar a aderência dos núcleos. Esta tentativa também não causou o efeito desejado. Portanto, após estes esforços optou-se em utilizar as lâminas convencionais e realizou-se a técnica do esfregaço, e após a avaliação de algumas lâminas observou-se que o objetivo tinha sido atingido. Esta foi a principal dificuldade para a realização deste estudo. Outros apresentaram outras dificuldades como, GUILGEN (1997) estudando casos de lesões cutâneas melanocíticas, perdeu 7 casos, dos 40 inicialmente propostos. A perda se deu em virtude dos blocos terem sido previamente submetidos a uma microtomia para o diagnóstico histopatológico e, quando necessitou-se realizar uma segunda microtomia de 80 micra para a análise citofotométrica, os 7 blocos não possuíam fragmentos histológicos com a lesão melanocítica em profundidade suficiente. No presente estudo para evitar-se este problema, um dos critérios que usou-se para descartar o bloco é a pouca profundidade do material no bloco de parafina. Em 1987, DANOVA, RICCARDI, MAZZINI, WILSON, DIONIGI, BRUGNATELLI, FIOCCA, UCCI, JEMOS e ASCARI, analisando a citometria de fluxo do ADN em material a fresco e parafinado, notaram que a qualidade das peças provenientes de material arquivado em blocos de parafina era de qualidade inferior à amostragem oriunda de material a fresco. Não destacam, neste estudo, quais os possíveis fatores que contribuíram para esta baixa de qualidade. Como este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa, aonde vários estudos foram realizados e outros estão em desenvolvimento tanto de material a fresco como em material de arquivo, parece ser unânime a hipótese de que a não-observância de protocolos de parafinização, da utilização de substâncias de qualidade duvidosa, estocagem em locais não adequados ( portanto submetendo o material arquivado a diferentes exposições de luz, temperatura, umidade relativa do ar e outras ), são os principais fatores a contribuir para a queda de qualidade da amostragem originária de blocos de parafina.

Após todas as etapas na preparação das lâminas e vencidas as dificuldades acima mencionadas, o material foi enviado à Universidade Livre de Bruxelas, para análise final da sua qualidade. Como todo o resultado do trabalho depende de uma boa escolha dos núcleos que serão lidos pelo *software* a preocupação era saber se a qualidade e quantidade do material presentes na lâmina, a coloração, o ADN nuclear iriam fornecer informações fieis e confiáveis para os resultados e conclusões. As avaliações feitas foram positivas e o material foi considerado de boa qualidade. Ficou uma ressalva e recomendação em relação à fixação do material em formalina e posterior confecção dos blocos de parafina, que na opinião do Prof. Kiss deveriam ser padronizadas.

## 5.5 CITOMETRIA DO ADN

Há vários anos tem-se estudado o conteúdo de ADN nuclear, sua organização e textura, com o objetivo de auxiliar a patologia tradicional e as classificações histo-patológicas dos tumores malignos. Mais modernamente, através de dois métodos que utilizam recursos da informática citometria de fluxo e a citofotometria ou análise computadorizada da imagem nuclear, pôde-se obter parâmetros ainda mais detalhados do conteúdo do ADN nuclear auxiliando e detalhando ainda mais as classificações patológicas. Quando analisou-se as peças de um laboratório de patologia, observou-se que em 20% dos casos permaneciam dúvidas, isto é, lesões limítrofes entre peças de origem malignas e benignas. Nestes casos a citofotometria pôde identificar padrão aneuplóide que confirma tratar-se de uma lesão maligna. Portanto, do ponto de vista clínico fica evidente a importância deste método que terá grande contribuição no tratamento e prognóstico nas doenças neoplásicas. Para que esta conclusão tenha fundamentação científica, a interpretação dos casos deve ser feita baseando-se em um banco de dados morfonuclear, individual para cada tipo de tumor, pois o perfil do ADN varia conforme o tipo tumoral.

Os métodos de citometria de fluxo e a citofotometria tiveram suas bases descritas nos anos 60, porém a citometria de fluxo teve um impulso inicial maior por se basear na leitura eletrônica das informações nucleares, que naquela época, se encontrava em nível de desenvolvimento superior ao da informática (KATEMENSKI

& MELAMED , 1967). Para a realização da citometria de fluxo parte-se da suspensão celular de um tumor sólido, com milhares de núcleos. A vantagem desta técnica é a possibilidade de leitura de milhares de núcleos em curto espaço de tempo. A desvantagem é que, não tem-se a possibilidade de seleção morfológica dos núcleos das células tumorais e núcleos de células não tumorais, células do tecido conjuntivo e células de tecido inflamatório. Para que se possa identificar um tumor, é necessário que a amostra contenha pelo menos de 10 a 15% de células tumorais. Portanto, mesmo em casos de tumores altamente malignos, mas com grande quantidade de tecido não tumoral, não é possível a identificação. Outros problemas que limitam a ação da citometria de fluxo ocorrem nas lesões limítrofes, as dificuldades em criar banco de dados morfonucleares e a avaliação da distribuição nuclear do ADN.

A citometria de imagem permite o estudo do ADN em tecido tumoral sem manipulação prévia ou a partir de núcleos previamente selecionados, em material de esfregaço, a fresco ou utilizando material de arquivo parafinado. BAAK em 1987 escreve no seu manual de patologia tumoral que fica mantida a possibilidade de controle morfológico dos núcleos, mesmo que os resultados sejam obtidos com análise de uma menor quantidade de núcleos.

BOWMAN (1995), comparou os métodos de citometria de fluxo e a citofotometria e encontrou três causas responsáveis pelas diferenças dos resultados entre as técnicas: a relação entre tecido tumoral e tecido não tumoral, o grau de diferenciação ou malignidade tumoral e as variações entre as técnicas. COPE (1991), também comparou a citometria de fluxo com a citofotometria de imagem e ressalta que a qualidade dos resultados obtidos após a citocentrifugação é superior aos resultados obtidos, quando comparado aos realizados sobre cortes de cinco micra.

A técnica de citofotometria de imagem encontra-se em fase avançada de desenvolvimento metodológico e reconhecimento científico no Brasil, em especial nas diversas linhas de pesquisa que estão sendo desenvolvidas no Instituto de Pesquisas Médicas da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná/Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. Suas bases são lógicas e objetivas e fazem prever um grande ganho na compreensão do comportamento tumoral e sua utilização na escolha da conduta mais apropriada ao paciente.

### 5.5.1 Sistema SAMBA 4000: *Software* e seus parâmetros

O grande número de variáveis que encontra-se no mundo biológico, dificultam o seu estudo pela própria evolução natural da biologia e pelos fatores subjetivos de interpretação dos fenômenos biológicos. O sistema de análise de imagem computadorizada SAMBA 4000 foi desenvolvido com o intuito de minimizar estes fatores de interpretação, objetivando quantificar e qualificar os fenômenos biológicos.

O sistema SAMBA foi desenvolvido na França pela Alcatel, e teve no grupo de pesquisa do Prof. Dr. KISS, da Universidade Livre de Bruxelas, o pioneirismo na utilização deste método. A versão inicial foi a do SAMBA 200, com definições de imagem muito inferior em relação aos dias de hoje e o *software* apenas foi desenvolvido para estudo dos níveis de cinza, mas mesmo assim foi utilizado para várias pesquisas, como a de KISS (1989), LARSIMONT (1989), LAUNOIT (1989). A próxima evolução foi para a versão SAMBA 2005, que apresentava câmera preto e branca como na versão anterior, mas com melhor definição das imagens porque apresentava maior número de pontos de imagem analisados por cada núcleo. Esta versão foi utilizada nos trabalhos de: KISS (1992), GASPERIN (1992, 1994), BUDEL (1994, 1997), FRANCISCO (1995), SALMON (1992). A versão seguinte foi o SAMBA 2005 em cores, utilizando-se de uma câmera em cores e *software* capaz de transformar o estudo em níveis de cinza, quando necessário, para o estudo do ADN, assim como estudar e quantificar cores, aumentando o seu campo de aplicação com vistas à quantificação histoquímica. Esta última versão quando lançada, recebeu o nome de SAMBA 4000, sendo um dos seus exemplares brasileiros instalado no IPEM e utilizada neste estudo.

Seguindo o princípio da segmentação e numerização da imagem, a análise de cada núcleo celular pelo Sistema SAMBA 4000 permite o cálculo de 15 diferentes parâmetros. Três grupos de variáveis são estudados no SAMBA 4000, a variável morfométrica que significa a soma dos pontos de imagem ocupados pelo núcleo; as variáveis densitométricas que descrevem as características dos níveis de cinza ou densidade, segundo quantidade e desvios; e as variáveis texturais, que estudam como os níveis de cinza se distribuem dentro do núcleo.

## 5.6 TRANSFORMAÇÃO CANÔNICA E GERAÇÃO DO BANCO DE DADOS

Conforme o dicionário AURÉLIO (1988), a estatística é método que objetiva o estudo dos fenômenos de massa, isto é, os que dependem de uma multiplicidade de causas, e tem por fim representar, sob forma analítica ou gráfica, as tendências características limites desses fenômenos.

O termo “estudo estatístico multivariado” tem na sua definição a base de cálculo, que comporta múltiplas variáveis consideradas simultaneamente. Neste estudo cada parâmetro corresponde a uma variável. Aqui utilizou-se a análise multivariada com base em um gráfico para diferenciar as duas populações de núcleos celulares em estudo, ou seja, núcleos dos tumores da pequena e grande curvaturas do estômago. Este tipo de estudo possui duas vantagens principais: maior poder discriminatório entre os grupos de estudo e indicar entre os parâmetros utilizados no estudo, o valor discriminante de cada parâmetro. Este tipo de cálculo foi originalmente proposto por BARTELS em 1980 (apud PAUWELS e KISS, 1991); ele estabeleceu que, em citologia quantitativa, se tornou regra que: determinada população celular é definida não com base em uma só, porém em diversas propriedades. Para BARTELS a análise multivariada é apropriada para descrever diferenças entre células, alterações graduais que possam vir a surgir entre populações celulares, ou ainda discriminar células de características diferentes. Este princípio de cálculo foi amplamente utilizado desde então, demonstrando sua aplicabilidade não só em estudos de caracterização morfonuclear como também na determinação prognóstica de tumores.

A representação gráfica da análise multivariada nas coordenadas X e Y mostra uma imagem das semelhanças ou diferenças entre os núcleos tumorais da pequena e grande curvaturas do estômago, diferença esta que irá considerar todos os parâmetros analisados ao mesmo tempo. Cada núcleo é colocado espacialmente segundo a resultante dos vetores representantes de cada um dos parâmetros. Todos os núcleos dos tumores da pequena e grande curvaturas do estômago são colocados no espaço dimensional formando uma “nuvem” de núcleos. O *software* “CLUSTER” encontra o melhor ângulo a partir do qual o observador pode visualizar a maior diferença entre as populações nucleares de cada grupo de estudo. Através da

linha discriminante de Fisher, melhor separando as duas populações nucleares, é possível isolar os núcleos considerados semelhantes entre as respectivas populações por meio de duas filtragens matemáticas, gerando uma imagem gráfica final, com o número de núcleos que serão estudados através dos parâmetros matemáticos.

## 5.7 ANÁLISE DOS PARÂMETROS MATEMÁTICOS CALCULADOS PELO COMPUTADOR

### 5.7.1 Variável morfométrica

A variável morfométrica representa a área nuclear, estando em correlação direta com o número de pontos de imagem que representam um núcleo.

No presente estudo, o cálculo da área nuclear (parâmetro 1) foi extremamente significativo maior nos tumores de câncer gástrico da pequena curvatura quando comparados aos tumores da grande curvatura ( $p < 0,001$  com  $F = 15,13$ ). Desta forma podemos considerar que este parâmetro é capaz de identificar o núcleo oriundo de um carcinoma gástrico da pequena e outro da grande curvaturas.

### 5.7.2 Variáveis densitométricas

As variáveis densitométricas são calculadas tomando-se como base à absorção de luz em cada ponto de imagem, isto é, quanto maior a concentração de pigmento, maior a absorção e menor a intensidade de luz captada pelo fotodiodo no ponto de imagem correspondente. Como o parâmetro 3 é representado pela razão do parâmetro 2 sobre 1, e desta forma o seu resultado é puramente cálculo matemático, optou-se em não mencioná-lo neste estudo.

Os parâmetros 5 e 6, não apresentaram resultados significantes, portanto, não serão discutidos, porque através deles não tem-se diferenças entre os núcleos dos tumores da pequena e grande curvaturas do estômago.

### 5.7.3 Parâmetros 2 e 4

A soma da densidade de todos os pontos que ocupam um núcleo é representada pelo parâmetro 2, o qual neste estudo é representado pelo número absoluto.

No cálculo da densidade óptica integrada, observou-se uma maior densidade entre os núcleos dos tumores da pequena curvatura quando comparados aos núcleos dos tumores da grande curvatura gástrica ( $p < 0,001$   $F= 35.88$ ).

Durante o ciclo celular, a diminuição dos valores do coeficiente de assimetria (parâmetro 4) traduzem a descondensação da cromatina. Se este índice for negativo a maioria dos pontos de imagem nuclear estará associada a valores baixos e o núcleo terá aspecto globalmente pálido. Quanto maior o índice mais pontos de imagem terão valores altos e mais denso será o núcleo. O coeficiente de assimetria foi variável que mostrou diferença extremamente significativa entre os núcleos da pequena e grande curvaturas, ficando os núcleos da pequena curvatura com índices mais altos, portando sendo núcleos mais densos ( $p < 0,001$   $F= 31.36$ ).

Tanto o parâmetro 2 e o 4 podem ser usados para diferenciar um núcleo que pertence a um tumor da pequena e grande curvaturas de forma segura, devido às informações fornecidas por este estudo.

### 5.7.3 Variáveis texturais

Este é o último grupo de variáveis e refere-se aos parâmetros ligados à textura da cromatina nuclear. Estes parâmetros são divididos em dois grupos distintos: os ligados ao comprimento de secção da cromatina, parâmetros 7, 8, 9, 10 e 11, que não apresentaram valores significativos, portanto não serão discutidos e os parâmetros derivados das matrizes de coocorrência, parâmetros 12, 13, 14 e 15. Destes parâmetros, apenas o parâmetro 14 apresentou valores não significativos, desta forma não será discutido.

#### 5.7.3.1 Parâmetros derivados das matrizes de coocorrência

Baseados em matrizes de coocorrência,  $M(i,j)$ , de valores de densidade óptica, estes parâmetros descrevem a freqüência na qual dois pontos de imagem vizinhos apresentam nível de densidade óptica "i" e outra "j". A vizinhança entre os pontos de imagem "i" e "j" são definidos por uma distância "d" e um ângulo "a". A distância "d" é da ordem de alguns pontos de imagem, enquanto o ângulo "a" corresponde geralmente a um dos pontos:  $0^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $90^\circ$  e  $135^\circ$ . Assim, para valores fixos de "d" e "a", a matriz  $M(i,j)$  é simétrica e descreve o número de "ocorrências" na imagem nuclear que apresente os níveis de intensidade "i" e "j", sendo separados por uma distância "d" dentro de uma direção "a". Quatro parâmetros representativos da distribuição de pares de pontos pertencentes à matriz são calculados.

A média local (parâmetro 12) mede o grau global de condensação da cromatina. O valor absoluto diminuiu para os núcleos dos tumores da pequena curvatura em relação aos tumores da grande curvatura ( $p < 0,05$   $F = 4.72$ ).

O segundo momento ou energia (parâmetro 13) traduz a heterogeneidade da distribuição dos pares de pontos da matriz. Em números absolutos a pequena curvatura apresenta valores maiores quando comparado com a grande curvatura ( $p < 0,001$   $F = 17,27$ ).

Finalmente, o contraste (parâmetro 15), descrito originalmente por BRUGAL (1977), mede o contraste entre as regiões nucleares com diferentes valores de intensidade. Aumenta em geral com o aumento do número de pequenos agrupamentos de cromatina, densos e bem individualizados. Os valores absolutos mostraram uma diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$   $F = 25.92$ ), com diminuição para os tumores da grande curvatura.

## 5.8 FACIT

Novos estudos nesta linha de pesquisa devem determinar parâmetros citofotométricos de todos os tumores malignos e tumores com potencialidade de malignização. Desta forma pode-se acabar com a subjetividade da análise patológica e passar-se a dados objetivos que podem caracterizar os mais diversos tumores com pequena margem de erro. Ou seja, tem-se uma classificação histopatológica baseada em parâmetros citofotométricos que são determinados pela análise computadorizada do material, diminuindo a influência subjetiva. Com isso o tratamento e o prognóstico podem ser realizados com maior rapidez e segurança.

Para que os resultados destes parâmetros, que darão origem as características individuais de cada tumor tenham menor possibilidade de erro, deve-se padronizar o preparo do material desde a coleta da amostra, fixação e confecção dos blocos de parafina.



## 6 CONCLUSÕES

1) A citofotometria do ADN dos núcleos das células dos tumores malignos do estômago da pequena e grande curvaturas foi capaz, através de seis parâmetros (1, 2, 4, 12, 13 e 15) dos quinze estudados, diferenciar os núcleos da pequena e grande curvaturas.

2) Mesmo não tendo a informação da localização anatômica prévia do tumor, através do estudo destes parâmetros, pode-se sugerir a sua localização.



## ANEXO 1

## RESULTADOS DA CITOFOTOMETRIA

RE953612 – PC (Caso 1)					RE974833 – PC (Caso 2)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 201; 15 parameters					Total number of objects : 210; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	9 653.14	2842.53	9260.17	10046.1	1	8588.23	2520.61	8247.31	8929.15
2	4 520.55	2863.00	4124.75	4916.36	2	3261.90	1278.57	3088.97	3434.84
3	0 00000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2. 12438	2.14626	1.82766	2.42109	4	2.35714	1.81031	2.11229	2.60199
5	7. 90547	3.83828	7.37484	8.43611	5	6.76190	2.76724	6.38763	7.13618
6	414.706	530.270	341.398	488.015	6	420.062	335.265	374.716	465.407
7	45.0697	7.60041	44.0189	46.1204	7	45.9619	7.85392	44.8996	47.0242
8	15.5423	7.65028	14.4847	16.5999	8	14.8952	7.56360	13.8722	15.9182
9	22.5821	6.06880	21.7431	23.4211	9	23.2381	6.34489	22.3799	24.0963
10	15.7711	6.75347	14.8375	16.7048	10	17.5857	5.66146	16.8200	18.3514
11	70.8209	14.9346	68.7562	72.8856	11	72.4143	15.1866	70.3603	74.4683
12	230.851	110.277	215.605	246.096	12	199.043	85.4623	187.484	210.602
13	6.33333	5.02465	5.63869	7.02798	13	6.79048	4.67046	6.15878	7.42217
14	331.224	66.8370	321.984	340.464	14	320.148	58.6394	312.216	328.079
15	669.677	417.075	612.017	727.336	15	702.052	440.721	642.444	761.661
RE96069 – CG (Caso 3)					RE974857 – GC (Caso 4)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 200; 15 parameters					Total number of objects : 224; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7752.95	1373.56	7562.58	7943.32	1	7483.17	1614.99	7271.67	7694.67
2	2145.06	637.667	2056.69	2233.44	2	2088.70	686.136	1998.85	2178.56
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.89000	2.83864	3.49658	4.28342	4	1.10268	1.07454	.961959	1.24340
5	4.34000	1.45753	4.13800	4.54200	5	5.28571	2.13779	5.00575	5.56568
6	646.515	1035.79	502.962	790.068	6	376.504	119.706	360.828	392.181
7	41.4450	3.73323	40.9276	41.9624	7	40.8304	5.17099	40.1532	41.5075
8	19.3950	6.28959	18.5233	20.2667	8	19.1473	7.67246	18.1426	20.1521
9	19.3800	2.90269	18.9777	19.7823	9	19.2857	4.05085	18.7552	19.8162
10	23.9300	5.19472	23.2100	24.6500	10	21.5223	5.20040	20.8413	22.2034
11	62.3150	8.64269	61.1172	63.5128	11	62.8527	10.6075	61.4635	64.2418
12	123.730	42.9940	117.771	129.689	12	178.076	62.3999	169.904	186.248
13	11.9450	5.22704	11.2206	12.6694	13	9.37946	4.57709	8.78006	9.97887
14	262.005	41.9955	256.185	267.825	14	279.362	46.2106	273.310	285.413
15	416.815	176.618	392.337	441.293	15	451.518	268.190	416.396	486.639
RE972432 – PC (Caso 5)					RE96328 – CG (Caso 6)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 200; 15 parameters					Total number of objects : 201; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	10348.7	2566.29	9993.02	10704.4	1	13216.4	3670.78	12708.9	13723.8
2	2734.80	1025.92	2592.61	2876.99	2	3217.78	1283.65	3040.32	3395.24
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.82500	1.70715	2.58840	3.06160	4	3.78109	3.13095	3.34825	4.21394
5	6.16000	1.93246	5.89217	6.42782	5	4.18905	1.43311	3.99093	4.38718
6	671.905	733.776	570.209	773.601	6	827.965	1490.11	621.961	1033.97
7	45.9400	6.08166	45.0971	46.7829	7	40.9552	3.22352	40.5096	41.4009
8	15.0250	6.50726	14.1231	15.9269	8	23.0100	7.70151	21.9452	24.0747
9	22.8250	4.63296	22.1829	23.4671	9	18.6368	2.48827	18.2928	18.9808
10	18.6600	4.62973	18.0184	19.3016	10	24.0249	4.68876	23.3767	24.6731
11	71.1500	11.7634	69.5197	72.7803	11	58.6318	7.65187	57.5740	59.6897
12	178.560	47.4521	171.983	185.137	12	121.030	38.2227	115.746	126.314
13	7.95500	4.52029	7.32852	8.58148	13	13.5274	5.35975	12.7864	14.2683
14	308.955	48.7905	302.193	315.717	14	252.348	39.4038	246.901	257.796
15	713.090	332.539	667.002	759.178	15	389.776	185.588	364.119	415.433

RE964853 – CG (Caso 7)					RE951809 – PC (Caso 8)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 201; 15 parameters					Total number of objects : 200; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	8799.27	1365.05	8610.56	8987.99	1	10249.3	2007.49	9971.05	10527.5
2	2066.71	349.682	2018.37	2115.05	2	2055.19	385.623	2001.74	2108.63
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.90547	1.70046	2.67039	3.14056	4	3.60000	1.34907	3.41303	3.78697
5	4.77612	1.23168	4.60584	4.94640	5	4.06000	1.21918	3.89103	4.22897
6	657.652	369.098	606.625	708.679	6	685.875	255.336	650.487	721.263
7	41.5522	3.07591	41.1270	41.9775	7	40.9250	3.57343	40.4297	41.4202
8	22.9254	9.10903	21.6661	24.1847	8	22.7200	7.63031	21.6625	23.7775
9	18.9602	2.29392	18.6431	19.2773	9	18.7900	2.66005	18.4213	19.1587
10	22.2537	4.30553	21.6585	22.8490	10	24.8400	4.38798	24.2319	25.4481
11	59.2040	8.01884	58.0954	60.3126	11	59.3200	8.29323	58.1706	60.4694
12	150.403	31.3428	146.070	154.736	12	119.230	29.0322	115.206	123.254
13	12.2139	5.40030	11.4674	12.9605	13	15.1150	5.96589	14.2882	15.9418
14	262.254	37.2002	257.111	267.397	14	248.425	38.2991	243.117	253.733
15	418.408	149.156	397.788	439.028	15	408.530	167.111	385.370	431.690
RE963318 – PC (Caso 9)					RE974445 – PC (Caso 10)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 210; 15 parameters					Total number of objects : 202; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	11866.0	3973.47	11328.6	12403.5	1	9492.40	1704.18	9257.38	9727.41
2	2741.45	1192.55	2580.16	2902.75	2	1990.15	260.023	1954.29	2026.01
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.10000	1.44897	2.90402	3.29598	4	2.92574	1.16442	2.76516	3.08632
5	4.37619	1.47564	4.17661	4.57578	5	4.84158	1.09664	4.69035	4.99282
6	620.795	335.824	575.374	666.216	6	642.228	268.755	605.165	679.290
7	41.1857	4.24363	40.6118	41.7597	7	43.0099	3.78899	42.4874	43.5324
8	20.9095	7.85684	19.8469	21.9722	8	16.7327	5.23108	16.0113	17.4541
9	19.1000	3.20334	18.6667	19.5333	9	20.5792	2.85563	20.1854	20.9730
10	23.5952	5.26832	22.8827	24.3078	10	21.7475	3.54052	21.2593	22.2358
11	61.2571	9.32232	59.9963	62.5180	11	66.1089	8.08362	64.9941	67.2237
12	125.943	33.7176	121.382	130.503	12	141.614	27.1643	137.868	145.360
13	12.5571	5.85288	11.7655	13.3488	13	10.1535	4.30648	9.55958	10.7474
14	261.976	44.8956	255.904	268.048	14	280.178	33.6812	275.533	284.823
15	454.852	199.198	427.910	481.794	15	529.421	180.237	504.565	554.276
RE974100 – PC (Caso 11)					RE961133 – PC (Caso 12)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 206; 15 parameters					Total number of objects : 242; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	10519.8	2808.06	10136.4	10903.3	1	8172.66	1627.59	7967.59	8377.72
2	2336.90	986.293	2202.21	2471.59	2	2143.38	455.863	2085.94	2200.81
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.75728	1.45125	2.55910	2.95546	4	2.02479	1.68838	1.81207	2.23752
5	4.10680	1.48724	3.90370	4.30989	5	5.85124	1.91627	5.60980	6.09268
6	575.922	314.556	532.967	618.878	6	539.306	523.122	473.396	605.216
7	40.2476	3.76001	39.7341	40.7610	7	41.9339	4.62966	41.3506	42.5172
8	22.0631	7.20106	21.0797	23.0465	8	19.9669	8.37246	18.9121	21.0218
9	18.4806	2.85696	18.0904	18.8707	9	19.7645	3.72038	19.2957	20.2332
10	24.5631	4.80427	23.9070	25.2192	10	19.5579	4.86074	18.9454	20.1703
11	59.4854	8.54101	58.3191	60.6518	11	62.7727	10.3106	61.4737	64.0718
12	121.534	38.1039	116.331	126.737	12	179.116	54.6119	172.235	185.996
13	13.4757	5.17433	12.7691	14.1823	13	9.45455	4.74995	8.85608	10.0530
14	251.786	40.9754	246.191	257.382	14	286.996	45.9512	281.206	292.785
15	404.131	175.460	380.170	428.092	15	480.930	233.838	451.468	510.392

RE951346 – PC (Caso 13)					RE93393 – PC (Caso 14)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 192; 15 parameters					Total number of objects : 206; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7582.42	1705.82	7341.13	7823.71	1	7764.34	1316.04	7584.62	7944.06
2	2340.84	897.807	2213.84	2467.83	2	2106.86	381.691	2054.74	2158.98
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.17188	1.44216	1.96788	2.37587	4	3.51942	1.56637	3.30552	3.73332
5	5.86458	2.36784	5.52965	6.19952	5	4.27184	1.00672	4.13437	4.40932
6	459.219	208.964	429.661	488.777	6	529.981	203.428	502.201	557.761
7	42.5990	6.56940	41.6697	43.5282	7	38.8981	3.92455	38.3621	39.4340
8	18.5260	8.59865	17.3098	19.7423	8	24.0243	7.61478	22.9844	25.0641
9	20.5938	5.22828	19.8542	21.3333	9	17.6019	2.88733	17.2076	17.9962
10	19.8281	5.76327	19.0129	20.6433	10	23.4320	3.70682	22.9258	23.9382
11	65.5521	13.6682	63.6187	67.4855	11	57.0000	8.29142	55.8677	58.1323
12	187.844	75.3716	177.182	198.505	12	129.184	25.8167	125.659	132.710
13	9.02083	5.38706	8.25883	9.78284	13	12.9175	4.59189	12.2904	13.5445
14	293.943	56.2246	285.990	301.896	14	255.481	32.9029	250.987	259.974
15	541.693	310.609	497.757	585.629	15	383.039	148.969	362.696	403.382
RE951889 – PC (Caso 15)					RE953485 – CG (Caso 16)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 225; 15 parameters					Total number of objects : 200; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7996.13	1657.57	7779.54	8212.72	1	10323.6	2315.24	10002.7	10644.5
2	1900.09	376.365	1850.91	1949.27	2	2164.53	684.974	2069.60	2259.46
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.29778	1.25618	3.13364	3.46192	4	4.62500	1.75624	4.38160	4.86840
5	5.76889	1.76884	5.53776	6.00002	5	5.04500	1.71259	4.80765	5.28235
6	687.369	292.721	649.120	725.618	6	855.635	406.003	799.366	911.904
7	45.8044	5.35139	45.1052	46.5037	7	43.7950	4.64684	43.1510	44.4390
8	14.7333	5.26033	14.0460	15.4207	8	17.3850	5.17366	16.6680	18.1020
9	22.6667	4.18675	22.1196	23.2137	9	20.8950	3.50342	20.4095	21.3806
10	19.3822	4.36202	18.8123	19.9522	10	21.9300	5.22830	21.2054	22.6546
11	70.8267	10.4329	69.4634	72.1899	11	65.5950	8.68049	64.3919	66.7981
12	155.876	48.5531	149.531	162.220	12	119.995	39.8825	114.468	125.522
13	8.40889	4.04990	7.87970	8.93808	13	10.7200	3.94989	10.1726	11.2674
14	302.898	43.4102	297.225	308.570	14	278.860	42.2112	273.010	284.710
15	687.640	308.566	647.321	727.959	15	560.750	264.609	524.077	597.423
RE953585 – GC (Caso 17)					RE972758 – GC (Caso 18)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 215; 15 parameters					Total number of objects : 204; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	8302.97	1900.26	8048.96	8556.98	1	8435.85	1720.51	8199.75	8671.95
2	1868.87	350.954	1821.96	1915.79	2	2079.29	366.378	2029.01	2129.57
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.31163	3.06982	1.90128	2.72197	4	1.98039	.901854	1.85663	2.10415
5	5.63721	2.02508	5.36652	5.90790	5	6.41667	1.91944	6.15327	6.68007
6	840.019	2737.28	474.124	1205.91	6	493.113	155.425	471.784	514.441
7	40.1488	4.59586	39.5345	40.7632	7	46.9853	6.53533	46.0885	47.8821
8	22.0930	9.70786	20.7954	23.3907	8	13.3873	5.75326	12.5977	14.1768
9	18.5767	3.51375	18.1071	19.0464	9	23.7990	5.11570	23.0970	24.5010
10	19.7907	5.38973	19.0702	20.5111	10	17.9657	4.41741	17.3595	18.5719
11	59.8977	10.4916	58.4953	61.3001	11	74.2108	12.3065	72.5220	75.8996
12	163.879	50.6881	157.104	170.655	12	190.191	54.5642	182.703	197.679
13	9.73488	5.32824	9.02265	10.4471	13	6.87255	3.66401	6.36975	7.37535
14	284.056	49.0173	277.504	290.608	14	318.740	45.3917	312.511	324.969
15	460.674	220.087	431.255	490.094	15	759.471	351.875	711.184	807.757

RE973362 - PC (Caso 19)					RE974281 - PC (Caso 20)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 200; 15 parameters					Total number of objects : 210; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7803.65	1894.62	7541.06	8066.23	1	8507.17	2277.14	8199.18	8815.16
2	2417.89	876.981	2296.35	2539.43	2	2589.00	740.402	2488.86	2689.14
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.35000	1.94358	3.08063	3.61937	4	1.64286	1.18365	1.48277	1.80295
5	5.86000	2.28482	5.54334	6.17666	5	5.83333	2.25427	5.52844	6.13823
6	604.220	781.987	495.842	712.598	6	402.957	144.272	383.444	422.470
7	43.5000	6.06960	42.6588	44.3412	7	42.9476	5.95955	42.1416	43.7537
8	17.7400	8.02511	16.6278	18.8522	8	18.2571	9.05068	17.0330	19.4813
9	21.1200	4.68247	20.4710	21.7690	9	20.7476	4.69327	20.1128	21.3824
10	19.5800	5.53115	18.8134	20.3466	10	20.0571	6.07310	19.2357	20.8785
11	66.6800	12.3372	64.9701	68.3899	11	65.9190	12.6746	64.2048	67.6333
12	170.555	61.8873	161.978	179.132	12	188.786	62.1522	180.379	197.192
13	9.31500	5.76158	8.51649	10.1135	13	8.92857	5.57372	8.17471	9.68243
14	295.620	54.6886	288.041	303.199	14	291.995	55.0904	284.544	299.446
15	597.530	312.498	554.220	640.840	15	523.776	295.836	483.764	563.789
RE974670 - PC (Caso 21)					RE962440 - GC (Caso 22)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 200; 15 parameters					Total number of objects : 220; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	9697.29	1814.49	9445.82	9948.77	1	9804.55	2451.60	9480.59	10128.5
2	2172.85	554.830	2095.95	2249.75	2	1967.66	554.898	1894.34	2040.99
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.64000	1.88955	2.37812	2.90188	4	1.59091	1.21577	1.43025	1.75156
5	3.48500	1.14881	3.32578	3.64422	5	4.56818	1.66512	4.34815	4.78822
6	533.190	331.001	487.316	579.064	6	459.355	238.283	427.867	490.842
7	38.0350	3.29450	37.5784	38.4916	7	39.9500	3.43143	39.4966	40.4034
8	25.2850	7.12276	24.2978	26.2722	8	23.9136	9.12871	22.7073	25.1199
9	16.9050	2.34007	16.5807	17.2293	9	18.0545	2.73640	17.6929	18.4161
10	26.8150	4.84569	26.1434	27.4866	10	23.4136	5.46366	22.6917	24.1356
11	55.2100	7.43007	54.1802	56.2398	11	57.7136	8.80367	56.5503	58.8770
12	108.985	30.6017	104.744	113.226	12	143.432	43.8884	137.632	149.231
13	15.0000	5.28772	14.2672	15.7328	13	12.6455	6.06643	11.8438	13.4471
14	235.365	37.4797	230.171	240.559	14	255.818	44.8802	249.888	261.749
15	333.285	145.234	313.157	353.413	15	362.118	167.656	339.964	384.273
RE952966 - PC (Caso 23)					RE974984 - GC (Caso 24)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 204; 15 parameters					Total number of objects : 200; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	8008.37	1550.80	7795.55	8221.18	1	7441.88	1486.33	7235.89	7647.88
2	2295.10	586.405	2214.63	2375.57	2	3164.93	952.427	3032.93	3296.93
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	5.38725	2.27347	5.07527	5.69924	4	1.37500	1.13771	1.21732	1.53268
5	6.38725	2.23870	6.08004	6.69447	5	8.84000	3.45751	8.36081	9.31919
6	941.113	542.475	866.670	1015.56	6	375.635	150.378	354.794	396.476
7	48.0049	5.88575	47.1972	48.8126	7	50.4950	8.56505	49.3079	51.6821
8	16.2255	6.86267	15.2837	17.1672	8	11.2300	6.51284	10.3274	12.1326
9	23.8578	4.70339	23.2124	24.5033	9	27.0300	7.09430	26.0468	28.0132
10	18.5588	5.12123	17.8561	19.2616	10	14.5250	5.87787	13.7104	15.3396
11	70.5343	11.8153	68.9129	72.1557	11	82.0400	16.5783	79.7424	84.3376
12	159.172	51.7365	152.072	166.271	12	275.245	102.736	261.007	289.483
13	9.71078	5.55010	8.94916	10.4724	13	4.65000	4.32637	4.05040	5.24960
14	302.613	51.3525	295.566	309.660	14	359.000	65.6488	349.902	368.098
15	818.093	394.781	763.918	872.268	15	947.640	511.035	876.814	1018.47

RE98226 – GC (Caso 25)					RE963414 – PC (Caso 26)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 200; 15 parameters					Total number of objects : 251; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7889.25	1493.31	7682.29	8096.22	1	9391.79	2465.45	9086.78	9696.80
2	2821.09	806.392	2709.33	2932.86	2	4336.73	1754.20	4119.71	4553.75
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.27500	1.70862	3.03820	3.51180	4	1.78486	1.26614	1.62822	1.94150
5	5.97500	1.71008	5.73799	6.21201	5	7.65737	2.61511	7.33385	7.98090
6	496.040	361.864	445.888	546.192	6	354.880	124.296	339.503	370.258
7	44.0300	5.30087	43.2953	44.7647	7	46.3745	8.15704	45.3654	47.3836
8	15.4650	5.77830	14.6642	16.2658	8	13.1235	5.86541	12.3979	13.8491
9	21.5850	4.00535	21.0299	22.1401	9	23.9323	6.31947	23.1505	24.7141
10	18.5850	4.55113	17.9542	19.2158	10	15.1235	4.38359	14.5812	15.6658
11	68.8700	10.3064	67.4416	70.2984	11	74.9084	14.4841	73.1165	76.7002
12	178.405	49.9483	171.483	185.327	12	234.474	77.6029	224.874	244.075
13	7.76000	4.64461	7.11629	8.40371	13	4.92032	3.17385	4.52767	5.31297
14	307.400	45.1469	301.143	313.657	14	342.526	52.6504	336.012	349.040
15	604.885	254.569	569.604	640.167	15	783.219	430.280	729.987	836.451

RE942868 – GC (Caso 27)					RE981043 – GC (Caso 28)				
Quick statistics					Quick statistics				
Total number of objects : 207; 15 parameters					Total number of objects : 185; 15 parameters				
Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval		Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	10139.4	1974.52	9870.42	10408.4	1	8325.26	2752.88	7928.57	8721.96
2	2122.46	747.514	2020.63	2224.30	2	2567.85	1314.39	2378.44	2757.25
3	.000000	.000000	.000000	.000000	3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.17874	1.40459	2.98740	3.37009	4	2.95676	2.89609	2.53942	3.37409
5	4.05314	1.30109	3.87589	4.23039	5	4.50811	1.94553	4.22775	4.78846
6	601.643	268.296	565.093	638.192	6	511.859	1074.87	356.968	666.751
7	41.2512	4.24658	40.6727	41.8297	7	39.0108	4.02558	38.4307	39.5909
8	18.2126	5.84859	17.4158	19.0093	8	24.5784	8.39534	23.3686	25.7882
9	19.4396	3.22205	19.0007	19.8786	9	17.4865	3.04756	17.0473	17.9256
10	24.9275	5.38647	24.1937	25.6613	10	23.4108	6.00215	22.5459	24.2757
11	63.4734	9.05100	62.2404	64.7064	11	56.4811	8.91768	55.1960	57.7661
12	110.435	33.5146	105.869	115.000	12	134.043	48.9505	126.989	141.097
13	11.9227	4.59193	11.2971	12.5483	13	12.4000	5.45270	11.6143	13.1857
14	259.464	40.2877	253.975	264.952	14	256.341	46.6367	249.620	263.061
15	439.386	196.554	412.610	466.163	15	348.724	194.286	320.727	376.721

## ANEXO 2

### PREPARO DO REATIVO DE SCHIFF

- a) 1g de fucsina básica (cloreto de para-rosanilina, Theodor Schuchardt-Munchen, número de referência 8195) foi misturado vigorosamente com 200 ml de água destilada fervente mediante uso de agitador mecânico.
- b) Resfriamento em meio ambiente a 50° C.
- c) Adição de 20 ml de ácido clorídrico 1 normal. Em seguida, deixou-se repousar a solução até que ela tivesse atingido a temperatura ambiente; nesse momento adicionou-se sob agitação vigorosa 1g de metabissulfito de sódio.
- d) Repouso da solução em câmara escura durante 24 horas.
- e) Adição de 2g de carbono ativado em pó (Noritt PN5, BDH), durante cinco minutos.
- f) A solução obtida foi submetida a três filtrações sucessivas (filtro de celulose) e armazenada a 4° C, até o momento da utilização.

### TÉCNICA DE COLORAÇÃO DO ADN SEGUNDO FEULGEN

- a) Dois banhos por imersão em água destilada (5 min cada um);
- b) Banho por imersão em ácido clorídrico 6 N (1h);
- c) Banho por imersão em água destilada (1 min);
- d) Banho por imersão em reativo de SCHIFF (1h);
- e) Três banhos de imersão em solução de água sulfurosa (5 min), a qual é composta de 100 de água destilada, 5 ml de ácido clorídrico 1 N e 5 ml de metassulfito de potássio a 10%;
- f) Banho sob água corrente;
- g) As lâminas foram desidratadas mediante imersões sucessivas em etanol a 70%, etanol a 99%, isopropanolol (2 etapas) e toluol ( 3 etapas).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ATKIN, N.B.; RICHARDS, B.M. Deoxyribonucleic acid in human tumors as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain; a comparison of tumors arising at different sites. **Brit. J. Cancer**, Basinzstoke, v.10, p.769-786, 1956.
2. BAAK, J.P.A. Quantitative pathology Today – A Technical View. **Pathol. Res. Pract.**, Stuttgart v.182, p.396-400, 1987.
3. BAAK, J.; KURVER, P.; DE SNOO-NIEWLAT, A. ; DE GRAEF, S.; MAKKINK, B.; BOON, M.E. Prognostic indicators in breast cancer: morphometric methods. **Histopathology**, v.6, p.327-39, 1982.
4. BARLOGIE, B.; RABER, M.; SCHUMANN, J.; JOHNSON, T.; DREWINKO, B.; SWATZENDRUBER, D.; GOHDE, W.; ANDREEFF, M.; FREIREICH, E. Flow cytometry in clinical cancer research. **Cancer Res.**, Baltimore, v.43, p.3982-97,1983.
5. BEGG, A.C.; HOFLAND, I.; MOONEN, L.; BARTELINK, H.; SCHARAUB, S.; BONTEMPS, P.; LE FUR, R.; VAN DEN BOGAERT, W.; CASPERS, R.; VAN GLABBEKE, M.; HORIOT, J.C. The predictive value of cell kinetic measurements in a european trial of accelerated fractionation in advanced head and neck tumors: an interim report. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, larrytown, v.19, p.1449-53, 1990.
6. BOSARI, S.; LEE, A.K.; WILEY, B.D.; HEATLEY, G.J.; HAMILTON, W.M.; SILVERMAN, M.L. DNA quantitation by image analysis of paraffin-embedded colorectal adenocarcinomas and its prognostic value. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 5, n. 3, p. 324-8, 1992.
7. BÖTTGER, T.; GABBERT, H.; STÖCKLE, M.; WELLEK, S.; MENKE, H.; JAUCKUS, H.C.; GRENZ, A.; HEINTZ, A.; JUNGINGER, T. Vergleich der DNS-Analyse mit histomorphologischen Parametern beim Magenkarzinom. **Langenbecks Arch. Chir.**, Berlin, v.377, p.4-8, 1992.
8. BOWMAN, R.; KANACKI, Z.A.; GARBEROGLIO, C.; CHASE, D.R. Comparison between image and flow cytometry. A priori factors that influence technique. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis MO v.17: p.277-283, 1995

9. BRIFFOD, M.; SPYRATOS, F.; HACÈNE, K.; TUBIANA-HULIN, M.; PALLUD, C.; GILLES, F.; ROUËSSÉ, J. Evaluation of breast carcinoma chemosensitivity by flow cytometric DNA analysis and computer assisted image analysis. **Cytometry**, New York, v.13, p.250-8, 1992.
10. BRUGAL, G.; CHASSERY, J.M. Un nouveau système d'analyse densitométrique et morphologique des préparations microscopiques. **Histochemistry**, Berlin v.52: p.241-258, 1977.
11. BRUGAL, G.; GARBAY, C.; GIROUD, G.F.; ADHEL, D. A double scanning microphotometric for image analysis: hardware, software and biomedical applications. **J. Histochem. Cytochem.**, v.27, p.144-152, 1979.
12. BUDEL, V.M. **Relação de análise computadorizada de imagem morfonuclear entre o câncer de mama que ocorre no ciclo gravídico puerperal e fora dele – análise comparativa de 110 casos.** Curitiba, 1994. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica – Setor de Ciências da Saúde) Universidade Federal do Paraná.
13. BUDEL, V. ; MERLE, S.; GASPERIN, P.; COLLET, J-F.; MAUBLANC, M-A.; KISS, R. Introduction of the cytological grading, the nuclear area, the ADN index and the ADN histogram type in the setting up of a score for ductal breast carcinoma. **Anticancer Res.**, Athenas v.14: p.2845-2852, 1994.
14. BUDEL, V.; GASPERIN, P.; HATSCHBACH, S.; CAVALCANTI, T.C.S.; PETEIN, M.; DECAESTECKER, C.; DARRO, F.; SALMON I.; KISS, R. Ploidy level determination and quantitative chromatin pattern description in pregnancy-associated breast cancers. **Brest Cancer Res. Treat.**, Dordrecht v.45: p.109-120, 1997.
15. CARLINI, M; GAROFALO, A.; RINALDI, D.; D'AGNANO, I.; D'ANGELO, C.; ZUPI, G.; VECCHIONE, A.; SANTORO, E. Gastric cancer cell DNA content correlates with early and late results after gastrectomy. **Int. Surg.**, Turin, v.79, p.114-9, 1994.
16. CASPERSON, T. A universal ultramicrospectograph for the optical range. **Exp. Cell Res.**, v. 1, p. 595-612, 1950.
17. COELHO, J. C. U. **Aparelho digestivo – Clínica e Cirurgia.** 1ª ed., Medsi – Editora médica e científica, Rio de Janeiro, p. 307-24, 1990.
18. COLLAN, Y.; TORKKELI, T.; KOSMA, V.M.; PESOSEN, E.; KOSUNEN, O.; JANTUNEN, E. Sampling in diagnostic morphometry: the influence of variation sources. **Pathol. Res. Pract.**, Stuttgart, v.182: p.401-6, 1987.

19. COPE, C.; ROWE, D.; DELBRIDGE, L.; PHILIPS, J.; FRIEDLANDER, R.M. Comparison of image analysis and flow cytometric determination of cellular DNA content. **J. Clin. Pathol.**, London, v.44, p.147, 1991.
20. DANGOU, J.M.; SALMON, I.; TORRES, L.; BUDEL, V.; NDIAYE, P.; PASTEELS, J.; VERHEST, A.; KISS, R. DNA histogram typing in retinoblastom and neuroblastom. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.6, p.408-413, 1993.
21. DANOVA, M.; MAZZINI, G.; WILSON, G.; UCCI, G.; DIONIGI, P.; RICCARDI, A.; FIOCCA, R. Ploidy and proliferative activity of human gastric carcinoma: a cytofluorometric study on fresh and on paraffin embedded material. **Basic Appl. Histochem.**, v.31, n.1, p. 73-82, 1987.
22. DANOVA, M.; RICCARDI, A.; MAZZINI, G.; WILSON, G.; DIONIGI, P.; BRUGNATELLI, S.; FIOCCA, R.; UCCI, G.; JEMOS, V.; ASCARI, E. Flow cytometric analysis of paraffin-embedded material in human gastric cancer. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v.10, n.3, p.200-6, 1988.
23. de LAUNOIT, Y. Thèse de doctorat en Sciences, intitulée: "Contribution de l'analyse d'images, l'étude de l'influence des hormones sur la prolifération cellulaires et la texture de la chromatine de diverses tumeurs. Mise au point d'un système expert d'aide au diagnostic anáthomopathologiste et à l'étude de nouvelles drogues antinéoplasiques". **Université Libre de Bruxelles**, 1989.
24. de LAUNOIT, Y.; KISS, R. In vivo influence of androgens on the cell kinetics and chromatin pattern of the MXT mouse mammary tumor treated or not by aminogluthetimide. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, Berlin v.115, p.129-138, 1989.
25. de LAUNOIT, Y.; KISS, R. In vivo relationship between morphonuclear parameters and hormone sensitivity of the murine MXT mammary tumor. **Anal. Cell Pathol.**, Limerick v.1: p.173-184, 1989.
26. DORMAN, D.M.; WALSH, T.N.; DROOGAN, O.; CURRAN, B.; HOURIHANE, D.O.; HENNESSY, T.P.; LEADER, M. DNA quantification of squamous cell carcinoma of the oesophagus image by flow cytometry and cytophometric image analysis using formalin fixed paraffin embedded tissue. **Cytometry**, New York, v.13, n.8, p. 886-92, 1992.
27. ENCHEV, V. Dna ploidy and morphometric features of normal, hyperplastic, Premalignant and malignant specimens: an evaluation. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v.20, n.4, p. 288-96, 1998.
28. ENCHEV, V.; RIGAUT J.P. Dynamic changes in quantitative features of human gastric lesions. **Anal. Cell. Pathol.**, Limerick, v.13, n.1, p. 9-16, 1997.

29. FEULGEN, R.; ROSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende Elektive Färbung von Seelherne in mikroskopischen Präparaten. **Z. Physiol. Chem.**, Leipzig, v.135, p.203-248, 1924.
30. FRANCISCO, J. **Caracterização dos efeitos radioterápicos induzidos "in vivo" por meio de análise de imagem no modelo experimental de adenocarcinoma mamário do tipo MXT.** Curitiba, 1997. Tese (Doutorado em Princípios de Cirurgia - Instituto de Pesquisas Médicas / Hospital Universitário Evangélico de Curitiba) Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.
31. FRANCISCO, J.; PAUWELS, O.; SIMON, S.; GASPERIN, P.; VAN HOUTTE, P.; PASTEELS, J.L.; KISS, R. Computer-assisted morphonuclear characterization of radiotherapy-induced effects in MXT mouse mammary adenocarcinomas surviving earlier radiotherapy. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, Larytown v. 32: p.409-419, 1995
32. GASPERIN JÚNIOR, P. **Caracterização das modificações morfonucleares, induzidas pela radioterapia, em tumor mamário: modelo murino.** Curitiba, 1995. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica – Setor de Ciências da Saúde) Universidade Federal do Paraná.
33. GASPERIN JÚNIOR, P. **Citometria do ADN do melanoma murino B16- F10 de sítio primário e metastático.** Curitiba, 1998. Tese (Doutorado em Princípios da Cirurgia – Instituto de Pesquisas Médicas / Hospital Universitário Evangélico de Curitiba) Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.
34. GASPERIN JR, P.; BUDEL, V.; PETEIN, M.; PASTEELS, J.; KISS, R. DNA histogram typing and DNA index measurements in 508 invasive breast carcinomas from fine-needle aspirates and imprint smears as opposed to formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Int. J. Oncology.**, v.5, p.589-95, 1994.
35. GASPERIN JR, P.; GOZY, M.; PAUWELS, O.; FRUHLING, J.; VAN HOUTTE, P.; PASTEELS, J.L.; KISS, R. Monitoring of radiotherapy-induced morphonuclear modifications in the MXT mouse mammary carcinoma by means of digital cell analysis. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, Larytown, v.22, p.979-87, 1992.
36. GIROUD, F. Thèse de Doctorat en Sciences, intitulée: "Approches cytométriques de la prolifération et de la différenciation: notion de faciès chromatinien". **Université Scientifique, Technologique et Médicale de Grenoble**, 1987.

37. GIROUD, F.; MONTMASSON, M.P. Reevaluation of optimal Feulgen reaction for automated cytology. Influence of fixatives. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v.11, p.87-95, 1989.
38. GUILGEN, G.A. **Estudo citofotométrico comparativo entre o nevo melanocítico, nevo displásico e o melanoma maligno.** Curitiba, 1997. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica – Setor de Ciências da Saúde) Universidade Federal do Paraná.
39. HALL, T.L.; FU, Y.S. Biology of disease. Applications of quantitative microscopy in tumor pathology. **Lab. Invest.**, Baltimore, v.53, p.5-21, 1985.
40. HARAGUCHI, M.; KORENAGA, D.; KAKEJI, Y.; ORITA, H.; MAEHARA, Y.; SUGIMACHI, K. DNA ploidy is associated with growth potential in gastric carcinoma. **Cancer**, Philadelphia, v.68, n.12, p.2608-11, 1991.
41. HARAGUCHI, M.; WATANABE, A.; MORIGUCHI, S.; KORENAGA, D.; MAEHARA, Y.; SUGIMACHI, K. DNA ploidy is a major prognostic factor in advanced gastric carcinoma. Univariate and multivariate analysis. **Surgery**, St. Louis, v.110, n.5, p.814-9, 1991.
42. HEDLEY, D.W.; FRIEDLANDER, M.L.; TAYLOR, I.E. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. **J. Histochem. Cytochem.**, v.31, p.1333-1335, 1983.
43. HEDLEY, D.W.; CLARK, M.C.; CORNELLISE, C.J.; KILLANDER, D.; KUTE, T. MERKEL, D. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. **Cytometry**, New York, v.14, p.482-85, 1993.
44. JAMES, P.D.; ATKINSON, M. Value of DNA image cytometry in the prediction of malignant change in Barrett's oesophagus. **Gut**, London, v. 30, p. 899-905, 1989.
45. JAPANESE RESEARCH SOCIETY FOR GASTRIC CANCER. The general rules for the gastric cancer study in surgery. **Japanese J. Surg.**, Tokyo, v.3, p.61, 1973.
46. KATEMENSKI, L.A. & MELAMED, M.R. Spectrophotometer cell sorter. **Science**, v. 156, p. 1364-65, 1967.
47. KIM, J.M.; LEE, D.K.; KIM, Y.K.; BAIK, S.K.; LEE, C.I.; KWON, S.O.; JUNG, S.H. DNA analysis by flow cytometry in early gastric cancer. **Korean J. Intern. Med.**, Yonsei, v.12, n 2, p.137-43, 1997.
48. KISS, R. Thèse de Doctorat en Sciences, intitulée: "Contribution à l'étude de l'hormonodépendance de une tumeur expérimentale murine et de cancers mammaires primitifs canis et humains". **Université Libre de Bruxelles**, 1987.

49. KISS, R.; GASPERIN JR, P.; VERHERS, A.; PASTEELS, J.L. Modification of the tumor ploidy level by the choice of the tissue taken as diploide reference in digital cell image analysis of Feulgen stained nuclei. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.5, p.655-60, 1992.
50. KISS, R.; de LAUNOIT, Y.; DANGUY, A.; PARIDAENS, R.; PASTEELS, J. Influence of pituitary grafts or prolactin administration on the hormone sensitivity of ovarian-hormone-independent mouse mammary MXT tumors. **Cancer Res.**, Baltimore, v.49, p.1945-2951, 1989.
51. KORENAGA, D.; HARAGUCHI, M.; TSUJITANI, S.; OKAMURA, T.; TAMADA, R.; SUGIMACHI, K.; INOKUCHI, K. Cytophotometric DNA analysis of gastric carcinoma. Relationship between DNA ploidy and lymph node metastasis. **Gan. No Rinsho**, v.32, n.1, p.45-9, 1986.
52. KORENAGA, D.; SAITO, A.; BABA, H.; WATANABE, A.; OKAMURA, T.; MAEHARA, Y.; SUGIMACHI, K. Cytophotometrically determined DNA content, mitotic activity and lymph node metastasis in clinical gastric cancer. **Surgery**, St. Louis, v. 107, n.3, p.262-7, 1990.
53. KOSS, L.G. Automated cytology and histology. A histological perspective. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St Louis v.9: p.369-374, 1987.
54. KOSS, L.G. The future of cytology. The wachtel lecture for 1988. **Acta Cytol.**, St Louis v.34: p.1-9, 1990.
55. KUSAMA, S.; WADA, T.; SAIGUSA, M. Diagnosis and treatment of Gastric Cancer. **Kanehara-Shuppan**, Tokyo, 1982.
56. KUWANO, H.; SUGIMACHI, K. DNA analysis and prognosis of digestive tract cancers. **Semin. Surg. Oncol.**, Philadelphia, v.6, n.1, p.38-35, 1990.
57. LARSIMONT, D.; KISS, R.; DE LAUNOIT, Y.; MELAMED, M.R. Characterization of the morphonuclear features and DNA ploidy of typical and atypical carcinoid and small cell carcinomas of the lung. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.4, p.378-88, 1990.
58. LARSIMONT, D.; KISS, R.; D'OLNE, D.; de LAUNOIT, Y.; MATTHEIEM, W.; PARIDAENS, R.; PASTEELS, J.L.; GOMPEL, C. Correlation between nuclear cytomorphometric parameters and estrogen receptor levels in breast cancer. **Cancer**, Philadelphia v.63: p.2162-2168, 1989.
59. LISON, L. **Histochimie et cytochimie animales – principes et méthodes**. Paris, 1953 Gauthier – Villars.
60. MAYALL, B.H. Current capabilities and clinical applications of image cytometry. **Cytometry Supplement**, New York, v.3, p.78-84, 1988.

61. MELLIN, W.; HEIDL, G.; KELLER, R.; REERS, B.; SASSE, W. DNA ploidy and prognosis of cardia and stomach carcinomas. A comparative flow and image cytometric analysis of paraffin-embedded tumor sections. **Zentralbl. Pathol.**, v.139, n.6, p.449-55, 1994.
62. MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. São Paulo: Pedagógica Universitária, 1980.
63. MIGUEL NETO, C. **Análise crítica da instalação, funcionamento e perspectivas de pesquisa com o sistema de citometria de imagem em hospital universitário**. Curitiba, 1997. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica – Setor de Ciências da Saúde) Universidade Federal do Paraná.
64. MINCIS, M. **Gastroenterologia e hepatologia: diagnóstico e tratamento**, 1º ed., Lemos Editorial, São Paulo, p.343-56, 1997.
65. MIZUNUMA, H.; TSUCHIYA, A.; ANDO, Y.; KIKUCHI, Y.; ABE, R. Flow cytometric DNA analysis of gastric cancer that is invading the muscularis propria. **Eur. J. Surg.**, v.162, n.11, p.889-94, 1996.
66. NOMINA anatomica. 5ª ed. Rio de Janeiro : **MEDSI**, p.35-37, 1987.
67. PARANÁ, Governo do Estado. **Normas para apresentação gráfica de dados: tabelas**. Curitiba, IPARDES, 1996.
68. PAUWELS, O.; KISS, R. Digital morphonuclear analysis of sensitive versus resistant neoplastic cells to vinca-alkaloid, alkylating and intercalating drugs. **Cytometry**, New York v.2, p.388-397, 1991.
69. PELSTRING, R.J.; HURTUBISE, P.E.; SWERDLOW, S.H. Flow-cytometric DNA analysis of hematopoietic and lymphoid proliferations: a comparison of fresh, formalin-fixed and B5-fixed tissues. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.21, n.5, p.551-8, 1990.
70. ROBBINS, S. & COTRAN, R. **Patologia estrutural e funcional**, 2ª ed., Interamericana, Rio de Janeiro, 1983.
71. SAITO, A.; KORENAGA, D.; HARAGUCHI, M.; MAEHARA, Y.; SUGIMACHI, K. Heterogeneity in gastric carcinoma with special reference to DNA content and mitotic activity: histopathologic differentiation. **J. Surg. Oncol.**, New York, v.51, n.1, p.14-8, 1992.
72. SALMON, I. Contribution de la description quantitative du faciés chromatinien pour l'aide au diagnostic et au pronostic des tumeurs de la glande thyroïde et du système nerveux Travail de thèse effectué en vue de l'obtention du titre d'Aggré de l'Enseignement Supérieur -**Université Libre de Bruxelles**, 1993.

73. SALMON, I.; GASPERIN, P.; PASTEELS, J.L.; HEIMANN, R.; KISS, R. Relationship between histopathological typing and cytomorphonuclear assessments from 238 thyroid cases: digital cell image analysis performed on Feulgen-stained nuclei from formalin-fixed paraffin-embedded materials. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia v.97, p.776-786, 1992.
74. SALMON, I.; KISS, R.; FRANC, B.; GAPERIN, P.; HEIMAN, R.; PASTEELS, J.L.; VERHEST, A. Comparison of morphonuclear features from normal, benign, and neoplastic thyroid tissues using digital cell image analysis. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St Louis v.14, p.47-54 1992.
75. SALMON, I.; KISS, R.; DEWITTE, O.; GRAS, T.; PASTEELS, J.L.; BROTCHE, J.; FLAMENT-DURAND, J. Relationship between histopathological grading and DNA ploidy as opposed to survival in 206 astrocytic tumors. **Cancer**, Philadelphia v.70, p.538-546, 1992.
76. SCHWARTZ, S.; SHIRES, G.; SPENCER, F.; STORER, E. **Princípios de cirurgia**, 4<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, 1987.
77. SCHULTE, E. Standardization of the Feulgen reaction for absorption DNA image cytometry: a review. **Anal. Cell. Pathol.**, Limerick, v.3, p.167-82, 1991.
78. SCHULTE, E.; WITTEKIND, D. Standardization of the Feulgen-Schiff technique. Staining characteristics of pure fuchsin dyes; a cytophotometric investigation. **Histochemistry**, Berlin, v.91, p.921-331, 1989.
79. SUH, K.S.; MIN, S.K. Flow cytometric DNA analysis of gastric cancer. Correlation with histology and clinical outcome. **J. Korean Med. Sci.**, v.8, n.5, p.348-54, 1993.
80. TSUCHIYA, N.; HOSHINO, K. Diagnostic significance of fluorocytometric DNA ploidy analysis of gastric cancer with special reference to its comparison with clinical and histopathological diagnosis. **Nippon Geka Hokan**, Kyoto, v.59, n.2, p.116-33, 1990.
81. TSUSHIMA, K.; NAGORNEY, D.; CHA, S.; REIMAN, H. Correlation of DNA ploidy, histopathology, stage, and clinical outcome in gastric carcinoma. **Surg. Oncol.**, Philadelphia, v. 1, n.1, p.17-25, 1992.
82. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de trabalhos**. 5.ed. Curitiba: Ed da UFPR, 1995.
83. VAN VELTHOVEN, R.; PETEIN, M.; ZLOTTA, A.; OOSTERLINCK, W.J.; VAN DER MEIJEN, A.; ZANDONA, C.; ROELS, H.; PASTEELS, J.L.; SCHULMAN, C.; KISS, R. Computer-assisted chromatin texture characterization of Feulgen-stained nuclei in a series of 331 transitional bladder cell carcinomas. **Journal of Pathology**, v.173, p.235-242, 1994.

84. YONEMURA, Y.; MATSUMOTO, H.; NINOMIYA, I.; OHYAMA, S.; KIMURA, H.; De ARETXABALA, X.; SUGIYAMA, K.; KAMATA, T.; KINOSHITA, K.; FUSHIDA, S. Heterogeneity of DNA ploidy in gastric cancer. **Anal. Cell. Pathol.**, v.4, n.2, p.61-7, 1992.
85. YONEMURA, Y.; MIYAZAKI, I. Quantitative estimation of malignancy of gastric cancer by DNA ploidy and proliferative activities. **Rinsho Byori**, v.38, n.9, p. 1053-8, 1990.
86. YONEMURA, Y.; OYAMA, S.; SUGIYAMA, K.; KAMATA, T.; De ARETXABALA, X.; KIMURA, H.; HOSAKA, T.; YAMAGUCHI, A.; MIWA, K.; MIYAZAKI, I. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in gastric carcinoma. **Cancer Res.**, Baltimore, v.50, n.3, p.509-14, 1990.
87. YONEMURA, Y.; SUGIYAMA, K.; KAMATA, T.; KOSAKA, T.; YAMAGUCHI, A.; MIWA, K.; De ARETXABALA, X.; MIYAZAKI, I. Correlation of DNA ploidy and clinical outcome in early gastric carcinomas. **Oncology**, Basel, v.47, n.1, p.49-54, 1990.
88. ZANDONA, C. **Caracterização dos tumores de ovário dos tipos seroso, mucinoso e de células da granulosa pela análise computadorizada da imagem do ácido desoxirribonucléico**. Curitiba, 1994. Tese (Mestrado em Princípios de Cirurgia – Instituto de Pesquisas Médicas / Hospital Universitário Evangélico de Curitiba) Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.
89. ZANDONA, C.; BUDEL, V.M.; LARSIMONT, D.; PETEIN, M.; GASPERIN, P.; PASTEELS, J.L.; KISS, R. Digital cell image analysis of Feylgen-stained nuclei from papillary, medullary, colloid, lobular and comedocarcinomas of the breast. **Anticancer Res.**, Athens, v. 4, p.2173-82, 1994.