

ERICKSON JOSÉ BLUN LIMA

**ESTUDO CITOFOTOMÉTRICO
DO ADN DE CÂNCER GÁSTRICO**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Doutor no Programa de pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de 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

Lima, Erickson José Blun
Estudo citofotométrico do ADN de câncer gástrico. – Curitiba, 2000.

90 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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

Ata do julgamento da 43ª tese de doutorado para conclusão do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Nível Doutorado da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno: ERICKSON JOSÉ BLUN LIMA com o título: "ESTUDO CITOFOTOMÉTRICO DO ADN DE CÂNCER GÁSTRICO.", realizada em 02 de outubro de dois mil.

*Às oito horas do dia dois de outubro de dois mil, no Auditório do 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná, teve início a prova em epígrafe, constituída a Comissão Examinadora pelos Professores Angelita Habr Gama, Antonio Rocha Gonçalves, Plínio Gasperin Júnior, Júlio Cesar Uili Coelho e Sérgio Brenner sendo este último Presidente da Comissão. Aberta a sessão foi apresentada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Ligoeki Campos Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Comissão convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Comissão Examinadora, obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Comissão Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavradura do Parecer Conjunto necessário. Os conceitos e notas atribuídos foram: Prof. Dra. Angelita Habr Gama: conceito " A " e equivalência " *dez* "; Prof. Dr. Antonio Rocha Gonçalves: conceito " A " e equivalência " *dez* "; Prof. Dr. Plínio Gasperin Júnior: conceito " A " e equivalência " *dez* "; Prof. Dr. Júlio Cesar Uili Coelho: conceito " A " e equivalência " *dez* "; Prof. Dr. Sérgio Brenner: conceito " A " e equivalência " *10* ". Voltando a sala de sessão, o senhor Presidente da Comissão leu os conceitos do Parecer Conjunto, dando como final o conceito " A " e equivalência a " *10,0* ", e a recomendação de que a tese com o título já referido, possa ser publicada na forma final nos meios de divulgação científica adequados, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos componentes da Comissão Examinadora.*

Angelita Habr Gama
Prof. Dra. Angelita Habr Gama

Antonio Rocha Gonçalves
Prof. Dr. Antonio Rocha Gonçalves

Plínio Gasperin Júnior
Prof. Dr. Plínio Gasperin Júnior

Júlio Cesar Uili Coelho
Prof. Dr. Júlio Cesar Uili Coelho

Sérgio Brenner
Prof. Dr. Sérgio Brenner

Se eu pudesse prolongar a minha vida, e eu sei que posso, trataria de vivê-la com mais sabedoria e prudência.

Tentaria não ser tão neurótico, estressado e às vezes depressivo.

Compreenderia mais as minhas limitações e fraquezas.

Procuraria ser mais alegre e me cercaria só de pessoas inteligentes, boas, energéticas e positivas.

Aprenderia mais sobre as artes, sobre filosofia ou mesmo sobre aquelas coisas mais simples da vida.

Seria cada vez mais uma criança, com sua inocência e imaginação livre.

Procuraria ser mais humilde e aprenderia a ouvir mais as pessoas.

Decidiria sobre as coisas importantes do dia-a-dia mais com o coração do que com a razão.

Trataria de sonhar mais sonhos impossíveis

Tentaria me dedicar mais no desenvolvimento das pessoas que me cercam.

Usaria sempre o bom senso, tanto nos momentos de dúvidas, quanto nos momentos de certeza.

Se realmente eu quisesse prolongar a minha vida, e eu sei que posso, trataria de praticar mais esportes, teria mais hábitos saudáveis, perderia vícios, caminharia regularmente, contemplaria mais o amanhecer, o entardecer e as estrelas.

Respeitaria mais o meu corpo, dormindo e me alimentando de forma mais controlada e saudável.

Procuraria ficar, algumas vezes, meditando em total silêncio, só para escutar as batidas do meu coração.

Não perderia tanto tempo tentando resolver problemas insolúveis.

Buscaria encontrar o equilíbrio perfeito entre a minha mente e o meu corpo.

Com certeza eu tentaria, de todas as formas possíveis e imagináveis, ter somente momentos de alegria e de realizações, porque é desses momentos que é feita a vida.

Se eu pudesse prolongar a minha existência, e eu sei que posso, trataria de estar mais junto dos meus filhos, dos meus amigos e das pessoas que eu aprendi a amar e admirar.

Felizmente, a minha vida está apenas começando, e tenho consciência de que, se cultivar somente hábitos e atitudes saudáveis, terei grandes chances de viver, quem sabe, muito mais do que 100 anos...”

Edson Bueno, inspirado na poesia “Instantes” de Jorge Luiz Borges.

**A Deus, pelas graças e bênçãos concedidas
e pelo dom da vida.**

À **Mariliz**, esposa, mãe, médica, uma mulher maravilhosa,
pelo amor, paciência, apoio, solidariedade e carinho.

Aos nossos amados filhos, **Camila, Marina e Gustavo**,
razão de todas as nossas lutas e motivo de orgulho em nossas vidas .

Ao meu pai e à minha mãe,

Reny e Clarice,

por tudo.

Ao meu sogro e à minha sogra,

Junius e Dulce,

Pelos muitos ensinamentos e por todo apoio.

Aos meus irmãos

João Artur, Emerson e Harmery,

pelo apoio e carinho, bem como pela

torcida constante pelo nosso sucesso.

AGRADECIMENTOS

“ Em toda luta por um ideal, é fundamental a presença de amigos, de aliados. O homem idealista une-se a eles em sua rota, irredutível em sua fé, imperturbável em sua ação. Porque quem marcha em direção à luz não pode ver o que ocorre na sombra. E, durante sua marcha, os aliados iluminam seu caminho.”

Baseado na frase de *Franklin Delano Roosevelt*

Tudo de bom que puder existir neste trabalho, deve-se:

Ao Prof. Dr. OSVALDO MALAFAIA,

orientador desta pesquisa, pela sua amizade , pelo incentivo constante, pelos ensinamentos teóricos e práticos na ciência médica e, especialmente pelos ensinamentos para a vida.

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS,

coordenador do curso de pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pelo seu apoio e compreensão durante o curso.

Ao Dr. RONALDO MAFIA CUENCA,

médico exemplar, amigo de todas horas, inclusive aquelas em que estivemos juntos nesta linha de pesquisa, discutindo e avaliando o trabalho, quando aprendi a admirá-lo e respeitá-lo ainda mais, como profissional e como ser humano.

Ao amigo Dr. MOACIR ARTEMIO ZANATTA,

amigo-irmão, presente em momentos de lutas e desafios, de alegria e de reflexão, incentivador constante, sempre disposto a apoiar e ensinar. Exemplo de ser humano. Tudo o que aqui venha a ser escrito, não conseguirá refletir a grandeza de sua importância em meu caminho.

Ao Prof. Dr. PLÍNIO GASPERIN JÚNIOR,

pelos seus ensinamentos na arte de desvendar os segredos da citometria de imagem e seu enorme despreendimento em colaborar em tudo que esteja ao seu alcance.

Ao Profs. Drs. CARMEM RIBAS E VINÍCIUS BUDEL,

pelo apoio e auxílio técnico na avaliação dos resultados.

Aos Drs. CÁSSIO ZANDONÁ E JEAN FRANCISCO FURTADO,

pela amizade e pelos ensinamentos na técnica da citometria de imagem.

Aos Profs. Drs. JOÃO CARLOS SIMÕES, JURANDIR MARCONDES RIBAS FILHO, NICOLAU GREGORY CZECZKO E SÉRGIO BRENNER,

pelos ensinamentos científicos, teóricos e práticos na arte da cirurgia digestiva.

Ao Prof. ROBERT KISS,

pela análise e reavaliação dos resultados desta pesquisa.

Ao amigo EDSON DE GODOY BUENO,

pelo muito que me ensinou, devido ao seu estilo empreendedor, espírito de perseverança, modelo de liderança e de dedicação ao ser humano.

Aos amigos de Brasília: ELIZER SOARES DE PAULA, FREDERICO COSTA, LUIZ FERNANDO CÓRDOVA, ROGÉRIO FREITAS e suas famílias,

pela amizade, carinho e incentivo constante em muitos momentos nestes últimos anos.

Aos inesquecíveis amigos de Curitiba: ANDRÉ MADUREIRA, CLAUDINEI LONDERO, EDILSON THIELE, FÁBIO SANTOS, JORGE BRANCO FILHO, MARCOS PETRINI, MURILO RIBAS, PAULO BETTES, PAULO NASSIF

e suas famílias, que apesar da distância espacial, continuam muito próximos, incentivando e torcendo pelo nosso sucesso.

Ao acadêmico de medicina GUATAÇARA ESSENFELDER SALLES JÚNIOR,

pelo seu valioso auxílio no processo de obtenção dos resultados da pesquisa.

À bióloga MÁRCIA REGINA INÁCIO,

pela dedicação e ajuda na operacionalização deste estudo.

Às secretárias EDLAINE ARAÚJO DOS SANTOS E MARLEI VIEIRA RIBEIRO,

pelo apoio e disposição para auxiliar no que fosse preciso.

Ao IPEM/Hospital Universitário Evangélico de Curitiba,

representado pelo Prof. Dr. Constantino Miguel Neto e por todo seu staff técnico e funcional, que proporcionou as condições necessárias para a realização desta pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma, por pequena que fosse, contribuíram para este momento tão importante em minha vida,

MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	xiii
	RESUMO	xiv
	ABSTRACT	xv
1	INTRODUÇÃO	2
1.1	OBJETIVO.....	4
2	REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1	CITOMETRIA DE IMAGEM E CITOMETRIA DE FLUXO.....	8
2.2	CITOMETRIA DE IMAGEM E CITOMETRIA DE FLUXO NO CÂNCER GÁSTRICO.....	12
2.3	CITOMETRIA DE IMAGEM E CITOMETRIA DE FLUXO NO CÂNCER GÁSTRICO – MATERIAL PARAFINADO.....	17
2.4	COLORAÇÃO DE FEULGEN.....	22
3	MATERIAL E MÉTODO	25
3.1	AMOSTRA.....	25
3.2	OBTENÇÃO DO MATERIAL DESTINADO À ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA.....	26
3.2.1	Preparo do material histopatológico.....	26
3.3	OBTENÇÃO DO MATERIAL DESTINADO À ANÁLISE CITOFOTOMÉTRICA.....	27
3.4	COLORAÇÃO DE FEULGEN.....	28
3.5	EQUIPAMENTO COMPUTADORIZADO – O SISTEMA SAMBA 4000..	28
3.5.1	Equipamentos componentes.....	29
3.5.2	Programa de computador (<i>Software</i>)	30
3.6	PROCEDIMENTO DE LEITURA.....	32
3.7	PARÂMETROS MATEMÁTICOS CALCULADOS PELO COMPUTADOR.....	33
3.7.1	Parâmetros ligados à morfologia do núcleo celular.....	35

3.7.2	Parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular.....	36
3.7.3	Parâmetros ligados à textura, à organização e à distribuição da cromatina nuclear.....	36
3.7.3.1	Parâmetros extraídos do histograma dos valores das densidades ópticas.....	36
3.7.3.2	Parâmetros obtidos das matrizes de comprimento das secções.....	38
3.7.3.3	Parâmetros obtidos da matriz de co-ocorrência.....	38
3.7.4	Tipagem do histograma do ADN.....	39
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
3.8.1	Análise monovariada.....	41
4	RESULTADOS.....	43
4.1	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	43
4.2	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MATEMÁTICOS CALCULADOS PELO COMPUTADOR.....	46
4.2.1	Parâmetros ligados à morfologia do núcleo celular.....	46
4.2.2	Parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular.....	48
4.2.3	Parâmetros ligados à textura, à organização e à distribuição da cromatina nuclear.....	49
4.2.3.1	Parâmetros extraídos do histograma dos valores das densidades ópticas.....	49
4.2.3.2	Parâmetros obtidos das matrizes de comprimento das secções.....	53
4.2.3.3	Parâmetros obtidos da matriz de co-ocorrência.....	54
4.3	TIPAGEM DO HISTOGRAMA DO ADN.....	55
5	DISCUSSÃO.....	58
5.1	DA ESCOLHA DA CITOMETRIA DE IMAGEM.....	58
5.2	DO MATERIAL DE ESTUDO E DA AMOSTRA.....	61
5.3	CÂNCER GÁSTRICO.....	63
5.4	DO DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO.....	64
5.5	DO PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E DA ANÁLISE CITOFOTOMÉTRICA.....	65
5.5.1	Do preparo da lâmina para análise citofotométrica.....	65

5.5.2	Do procedimento de leitura.....	66
5.6	DOS PARÂMETROS ANALISADOS PELO SISTEMA SAMBA 4000...	67
5.6.1	Variável morfométrica.....	67
5.6.2	Variáveis densitométricas.....	68
5.6.3	Variáveis texturais.....	69
5.6.4	Histograma do ADN.....	69
6	CONCLUSÕES	73
6.1	PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS.....	73
6.2	PARÂMETROS DENSITOMÉTRICOS.....	73
6.3	PARÂMETROS TEXTURAIS DA CROMATINA.....	73
6.4	PARÂMETROS DE PLOIDIA (TIPAGEM DO HISTOGRAMA).....	74
	ANEXOS – RESULTADOS DA CITOFOMETRIA	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE TABELAS

1	Análise histopatológica dos tumores gástricos.....	44
2	Correlação entre os graus de diferenciação e o padrão histológico e o resultado do parâmetro # 1.....	46
3	Valores da média, desvio e erro padrão dos casos moderadamente e bem diferenciados, em relação ao parâmetro # 1 (área nuclear)	47
4	Correlação entre os graus de diferenciação e o padrão histológico e o resultado estatístico dos parâmetros # 4 (VOD), # 5 (SK), # 6 (K)	49
5	Valores da média, desvio e erro padrão dos casos moderadamente e bem diferenciados, em relação ao parâmetro # 6.....	50
6	Valores da média, desvio e erro padrão dos casos pouco e moderadamente diferenciados, em relação ao parâmetro # 6.....	50
7	Correlação entre os graus de diferenciação e o padrão histológico e o resultado estatístico dos parâmetros # 7 (SRL), # 8 (LRL), # 9 (RLP), # 10 (GLD), # 11 (RLD)	53
8	Correlação entre os graus de diferenciação e o padrão histológico e o resultado estatístico dos parâmetros # 12 (LM), # 13 (E), # 14 (CV), # 15 (C).....	54
9	Correlação entre os padrões histológicos e tipos de histogramas de ácido desoxirribonucleico (ADN) dos tumores gástricos estudados.....	55
10	Correlação entre os graus de diferenciação na avaliação histológica e tipos de histogramas de ácido desoxirribonucléico (ADN) dos tumores gástricos estudados.....	56

RESUMO

O tumor gástrico maligno constitui-se atualmente numa das mais intrigantes doenças da oncologia e seu diagnóstico, terapêutica e prognóstico vem sendo objeto de pesquisa em vários pólos científicos. O objetivo do presente trabalho é avaliar o comportamento citofotométrico do ADN em casos de câncer gástrico, proveniente de material arquivado em blocos de parafina, no que se refere à taxa de ploidia nuclear e avaliação dos parâmetros morfométricos, densitométricos e texturais em 28 casos de adenocarcinoma gástrico. Tais parâmetros foram obtidos e analisados através da citometria de imagem em células coradas pelo método de FEULGEN, de material de arquivo fixado pela formalina, acondicionados em blocos de parafina, digeridos pela pronase a 0,05%, utilizando-se o processador de imagem SAMBA 4000, TITN, (Alcatel, Grenoble, França), no Instituto de Pesquisas Médicas do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba / Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Analisaram-se os resultados pelo estudo estatístico monovariado, utilizando-se o *software* do sistema SAMBA 4000. Os resultados demonstram que, da amostragem inicial, 41,2% dos casos foram considerados como tendo condições técnicas para compor o estudo. Não houve unanimidade do diagnóstico histopatológico em 10,7% da amostra, quando analisados os padrões histológicos intestinal e difuso e, em 21,4% quando avaliados os graus de diferenciação: bem, moderadamente e pouco diferenciado. Não houveram diferenças estatísticas quando comparados os padrões histológicos intestinal e difuso, em relação aos parâmetros matemáticos avaliados pelo SAMBA 4000. A área nuclear dos tumores considerados bem diferenciados foi significativamente maior do que aqueles considerados moderadamente diferenciados. A metodologia empregada evidenciou uma curva de tendência paralela entre os graus de diferenciação histológica e a ploidia nuclear, ou seja, quanto menor o grau de diferenciação (pouco diferenciado), maior a presença da aneuploidia e quanto maior o grau de diferenciação (bem diferenciado), maior a presença de diploidia. Na avaliação dos padrões histológicos intestinal e difuso, houve similaridade de resultados na ploidia nuclear. A citometria de imagem do ácido desoxirribonucleico (ADN), merece ter a multiplicação de sua aplicação em outros estudos de doenças gástricas, visando a validação técnica e clínica do método.

ABSTRACT

Actually gastric cancer is one of the most intriguing diseases of the oncology. The diagnosis, treatment and prognosis is coming object of research in various scientific centers. The aim of the present trial is to appraise the DNA-cytophotometric behavior of the gastric cancer cases using paraffin-embedded archival tissue and, for this, it analysis the nuclear ploidy status, the morphometry, densitometric and the textural features in 28 cases of gastric tumors, being all of them adenocarcinoma. This parameters was obtained and analysed by the DNA-cytophotometry in FEULGEN stain, using the SAMBA 4000 system (Grenoble, France) at the Medical Research Institute of the Evagelic Hospital / Evangelic Medical University in Curitiba/Paraná/Brazil. Monovariate statistics studies was applied with the SAMBA 4000 system software. The results showed that 41,2% of the inicial cases was considered with ideal technical conditions to compose this research. Unanimity was not find in the histopathological diagnosis in 10,7% of the sample, when analysed intestinal against diffuse histological patterns and in 21,4% when analysed the differents grades: well differentiated, moderately differentiated and poorly differentiated. It was not find statistical differences between intestinal and diffuse histological patterns, when studied the parameters by the SAMBA 4000 system. The nuclear area of the well differentiated tumors was statistically higher than moderately differentiated tumors. By means of the methodology, showed a parallel tendency curved line between the differents histological grades and the nuclear ploidy status. In the evaluation of the intestinal and diffuse histological patterns was encountered a similarity in the nuclear ploidy results. The study of DNA-cytophotometry must be increase in others researches of the gastric diseases to clinical and technical validation of this method.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias do aparelho digestivo constituem um dos mais importantes problemas da patologia humana. Destas, os tumores gástricos são bastante freqüentes, sendo que o carcinoma de estômago é o que mostra problemas clínicos significantes, tanto pela sua natureza maligna como pela sua elevada prevalência (Japanese Research Society for Gastric Cancer, 1973; KUSAMA, WADA e SAIGUSA, 1982).

Historicamente, os primeiros relatos de lesões malignas do estômago foram descritos por MORGANI em 1761. Em 1830, CRUVEILLIER tentou fazer distinção entre ulcerações gástricas benignas e malignas e, em 1839, BAILEY em seu livro intitulado "Tumores do estômago" descreve o aspecto clínico do câncer gástrico.

O desenvolvimento da radiologia para avaliação do estômago, principalmente pela escola alemã em 1910, representou importante avanço diagnóstico das doenças gástricas. A introdução da endoscopia permitiu o diagnóstico mais preciso e precoce das lesões gástricas. Da mesma forma, estudos citológicos obtidos de material de lavado e escovação gástrica, através da endoscopia, contribuíram decisivamente para o diagnóstico da doença maligna (MACHI, TAKEDA e KAKEGAWA, 1990).

O câncer do estômago apresenta alta incidência em países como Japão, Chile, Costa Rica, Colômbia, Hungria, Polônia, Rússia, Itália, Argentina e Brasil. No Brasil, excluindo-se o câncer de pele, é a primeira freqüência de câncer no sexo masculino (10,6%) e a quarta freqüência na mulher (3,9%) (BRUMINI, 1982 – citado por POSSIK & MINCIS, 1997).

O adenocarcinoma é o tipo histológico mais freqüente (95%), sendo que os tumores não-epiteliais constituem 5% e os mais freqüentes são os linfomas e os leiomiossarcomas. A Organização Mundial da Saúde classifica o adenocarcinoma gástrico em cinco tipos: tubular, papilar, mucinoso, com células em "anel de sinete" e indiferenciado.

Com relação ao padrão de crescimento do tumor associado ao aspecto histológico, LAURÉN em 1965, classificou os adenocarcinomas em intestinal (grau de metaplasia intestinal alto e crescimento tipo expansivo), difuso (grau de metaplasia intestinal baixo e crescimento tipo infiltrativo) e não-classificável (não possui as características dos tipos citados anteriormente)

O estadiamento bem padronizado em câncer é importante para que os casos possam ser estratificados em estágios mais avançados ou em estágios com doença mais localizada. A tentativa de uniformização tem o seu valor quando se comparam os resultados de tratamento entre várias instituições, quando se avaliam grupos semelhantes para se obter os valores prognósticos e também para propor estudos multicêntricos prospectivos com terapêutica adjuvante, em casos semelhantes e, dessa maneira, com bases científicas, obter melhora dos resultados de tratamento.

Nestes aspectos, o estudo anátomo-patológico tem papel fundamental no planejamento terapêutico de pacientes portadores de tumores gástricos malignos. Porém, apesar de um estadiamento histopatológico criterioso, o comportamento cancerígeno muitas vezes surpreende a medicina demonstrando que, se a morfologia estudada em uma lâmina histológica permite diagnóstico anátomo-patológico relativamente seguro, em contrapartida muito ainda tem a se desvendar no que tange à biologia tumoral e à dinâmica do aparecimento de metástases.

Os estudos das alterações nucleares tiveram seu grande impulso com o desenvolvimento da citometria de fluxo, a qual baseia-se na intensidade de luz que é emitida por determinada suspensão celular, previamente tratada com substâncias fluorescentes e que são captadas por um feixe de raios laser. Esta luminosidade é diretamente proporcional a quantidade de ácido desoxirribonucléico (ADN) contida no núcleo. Apesar dos grandes avanços no entendimento das alterações nucleares, sua grande restrição reside no fato de não permitir a análise individualizada de cada núcleo celular, como por exemplo a organização e a distribuição da cromatina.

Os grandes avanços na área da informática aprimoraram a análise da imagem nuclear, destacando-se então a citometria de imagem ou citofotometria. A coloração de FEULGEN, cuja característica fundamental é a grande afinidade pela cromatina, captada de acordo com sua quantidade e concentração, possibilita que

os núcleos corados tenham sua imagem de carga de ADN transformada em imagem numérica e quantificada em computador na forma de parâmetros.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é verificar se existem diferenças nucleares, sob o aspecto citofotométrico do ADN, entre os tumores gástricos classificados da maneira habitual, analisando os parâmetros: 1) morfométricos; 2) densitométricos; 3) de textura da cromatina e 4) de ploidia dos núcleos celulares, utilizando-se o sistema SAMBA 4000.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Técnicas modernas tem permitido novo direcionamento na conduta terapêutica no diagnóstico e prognóstico das especialidades médicas. Entre elas destacam-se a citometria de fluxo e a citometria de imagem ou citofotometria.

A crescente evidência ditando que a ploidia é de importância no prognóstico de patologias tumorais vem a cada dia reforçando o uso destas novas técnicas.

COPE, ROWE, DELBRIDGE, PHILIPS e FRIEDLANDER (1991) citam que a citometria de fluxo emergiu como valioso instrumento para análise de conteúdo celular e da atividade proliferativa do ácido desoxirribonucleico – ADN. O propósito desta técnica é avaliar a quantidade de ADN existente no núcleo celular, pela quantificação da intensidade luz que é emitida por uma suspensão celular submetida a tratamento com substâncias fluorescentes em resposta à aplicação de um feixe de raios laser. A luminosidade emitida será maior, tanto quanto maior for a quantidade de ADN existente no núcleo da célula.

Uma das grandes restrições da citometria de fluxo reside em ela não permitir o estudo individual de cada célula, ou mais detalhadamente de cada núcleo, uma vez que seu resultado é a medida de todas as células, com seus respectivos núcleos, que se encontram na amostragem, sejam eles patológicos ou sem quaisquer alterações.

Esta limitações desencadearam grande interesse em se avaliar o conteúdo do ADN, utilizando a análise por imagem de núcleos com auxílio da coloração de FEULGEN.

Na citometria de imagem ou citofotometria, a análise consiste no estudo e no tratamento numérico de imagens físicas.

COHEN, WALKER, SOLOMON e De ROSE (1992) citam que a citofotometria proporciona a seleção visual das células a serem avaliadas e identifica picos de tumores não diplóides, acima e abaixo daqueles do histograma obtido pela citometria de fluxo.

A citofotometria teve seu grande desenvolvimento após os estudos de CASPERSON (1936, 1950), que utilizou a coloração específica e quantitativa do ADN desenvolvida por FEULGEN & ROSENBECK (1924), o que permitiu quantificar o ADN nuclear através de um fotômetro com luz visível (CASPERSON, 1950; PASTEELS & LISON, 1950; ATKIN & RICHARDS, 1956).

O alto desenvolvimento tecnológico propiciou adição de parâmetros ligados à densitometria nuclear, de parâmetros morfométricos e de textura de cromatina celular (HARALICK, SHANMUGAUM e DINSTEIN, 1973; GALLOWAY, 1975; PRESSMAN, 1976), deu a possibilidade ao acesso de dados de cinética nuclear e ploidia. Em células normais, mudanças na aparência da cromatina celular refletem alterações nos padrões de ativação dos genes. Nos tumores, mudanças drásticas na aparência da cromatina celular são comuns e associadas com a evolução da doença (DOUDKINE, MACCAULAY, POULIN e PALCIC, 1995). Em 1995, GASPERIN JÚNIOR mostrou que existe estreita correlação entre os parâmetros citados e a situação das células dentro do ciclo celular, quais sejam, que a cromatina dos núcleos em fase S (fase de síntese de ADN, dentro do ciclo celular) é freqüentemente mais difusa que a dos núcleos em fase G1 (fase do ciclo celular em que a célula deixa a fase de repouso para iniciar o ciclo celular). Neste mesmo estudo, GASPERIN JÚNIOR citou que as restrições básicas da utilização da técnica de citometria de imagem nas décadas de 60 e 70 estavam correlatas ao custo proibitivo dos aparelhos de informática e à falta de *softwares* para sua aplicação prática e isto influenciou negativamente o avanço nos estudos citofotométricos.

2.1 CITOMETRIA DE IMAGEM E CITOMETRIA DE FLUXO

HALL & FU (1985) estudaram a utilização da microscopia quantitativa na patologia tumoral e concluíram que somente agora, apesar de seus 100 anos de existência, a microscopia quantitativa exerce influência de destaque no diagnóstico patológico, graduação de tumores malignos e grau de agressividade.

MAYALL (1988) estudou as capacidades clínicas da citometria de imagem. Cita que esta técnica é tecnologia familiar, disponível, de custos compatíveis e pronta a ser utilizada em laboratórios clínicos. Os resultados demonstram a importância clínica e de diagnóstico no uso do método. Sugere a multiplicação de sua aplicação em outros ensaios visando a sua validação técnica e clínica. A utilização da citofotometria visa avaliar, também, as respostas terapêuticas dos pacientes portadores de lesões pré-malignas ou malignas e conclui que a citometria, seja de fluxo ou de imagem, contribuirá para a melhoria da qualidade e racionalidade dos tratamentos, diminuindo a morbi-mortalidade.

JAMES & ATKINSON (1989) utilizaram a citofotometria do ADN para analisar alterações malignas no esôfago de Barrett. Foram estudados 91 biópsias esofagianas em 55 pacientes com o neopitélío. Detectaram aneuploidia em material de 6 pacientes, sendo que quatro destes desenvolveram displasia e adenocarcinoma subseqüentes. Em dois, já havia aneuploidia antes mesmo de haver displasia. Em revisões seguidas dos casos com aneuploidia, sempre houve associação morfológica, displasia ou carcinoma. Os autores concluem que a citometria de imagem é de grande utilidade para determinar os pacientes com risco de desenvolver malignidade.

PELSTRING, HURTUBISE e SWERDLOW (1990) detectaram que análise de ADN através da citometria de fluxo de tumores humanos utilizando material parafinado está se tornando um método crescente de determinação de ploidia e taxa de atividade proliferativa. Analisaram 16 amígdalas palatinas com hiperplasia e 28 neoplasmas linfóides hematopoiéticos 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 originadas das preparações fixadas não são equivalentes às informações obtidas de material a fresco. Os tecidos fixados com B-5 proporcionaram alternativa mais aceitável para as análises do que aqueles fixados com formalina.

KISS, GASPERIN JÚNIOR, VERHERS e PASTEELS (1992) estudaram a influência de cinco populações de núcleos celulares considerados como padrão diplóide para o estudo comparativo em casos de carcinoma de mama. Para tanto utilizaram 4 tecidos normais (linfócitos, tiróide, fígado e bexiga) e células mamárias normais que estavam presentes ao redor do tumor mamário. Determinaram o tamanho nuclear e o estudo do ADN mediante a análise computadorizada de imagem (SAMBA 2005), cujos núcleos foram corados pela técnica de FEULGEN. Concluíram ser 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, com variação máxima de área nuclear e densidade óptica integrada de 15% entre os núcleos de tecidos normais e o tumor que se analisa.

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. Utilizaram 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 8 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 G0-G1 e aumento das fases S e G2M. Nos dois primeiros grupos houve regressão tumoral em 1/10 (1º grupo) e 3/9 (2º grupo). 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. O SAMBA também calculou a área nuclear, a qual aumentou de forma significativa nas células quimiossensíveis e nos parâmetros texturais. Concluíram que estes métodos podem auxiliar na seleção de tumores quimiossensíveis.

BOSARI, LEE, WILEY, HEATLEY, HAMILTON e SILVERMAN (1992) avaliaram o conteúdo do ADN celular, o qual foi medido por citometria de imagem, em um estudo retrospectivo de 213 casos de carcinoma colorretal, provenientes de material embocado em parafina, que tiveram seu follow-up 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 da doença e nos carcinomas que atingiam o reto. O estágio patológico, a graduação histológica e a plodia foram relacionados individualmente com a sobrevida e a recorrência. Em pacientes sem metástases regionais ou à distância (DUKES A ou B), os 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, especialmente nos casos DUKES A e B.

GASPERIN, GOZY, PAUWELS, FRUHLING, VAN HOUTTE, PASTEELS e KISS (1992) estudaram as modificações morfonucleares induzidas pela radioterapia no tumor mamário murino MXT, mediante a análise de citometria de imagem nuclear (SAMBA 2005). Utilizaram as variáveis morfométricas, densitométricas e texturais. Haviam 3 grupos de camundongos com tumores MXT subcutâneos: grupo controle, grupo tratado com irradiação de 2 Gy e grupo tratado com irradiação de 8 Gy. Decorridas uma a quatro semanas de irradiação houve: aumento da área nuclear, dos grandes agrupamentos de cromatina e da energia; diminuição da condensação

global da cromatina e na densidade óptica integrada houve aumento na 1ª semana e diminuição na 4ª semana. O SAMBA mostrou-se útil para estudar os efeitos radioterápicos nucleares.

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 um controle seguro da população celular; impedimento de avaliação de estroma não-tumoral e núcleo celular de células inflamatórias, fragmentos nucleares, núcleos celulares degenerados, etc., o que não é possível com a técnica da citometria de fluxo, quando utilizado material arquivado.

DANGOU, SALMON. TORRES, BUDEL, NDIAYE, PASTEELS, VERHEST e KISS (1993) estudaram o tipo de histograma do ADN nos retinoblastomas e neuroblastomas. Utilizaram 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 revelaram que, com relação ao conteúdo do ADN, os retinoblastomas (mais aneuplóides) são bastante diferentes em relação aos neuroblastomas.

MELLIN, HEIDL, KELLER, REERS, SASSE (1994) estudaram o valor prognóstico da ploidia do ADN em ensaio comparativo entre a citometria de fluxo – FCM - e a citometria de imagem – ICM -, utilizando a coloração de FEULGEN em cortes histológicos de material parafinado proveniente de 221 peças ressecadas portando 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 da cárdia do que naqueles do estômago, devido à metástases linfonodais destes carcinomas serem bastante influenciados pelas condições locais da drenagem linfática e tensões mecânicas.

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, "imprint" e de material de blocos de parafina (utilizando o cytopin). 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.

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 cuidadosa e precisamente avaliados, além do que, estas lesões hiperplásicas, são potencialmente malignas com alto risco de desenvolvimento de câncer no futuro.

2.2 CITOMETRIA DE IMAGEM E CITOMETRIA DE FLUXO NO CÂNCER GÁSTRICO

KORENAGA, HARAGUCHI, TSUJITANI, OKAMURA, TAMADA, SUGIMACHI e INOKUCHI (1986) avaliaram 244 casos de carcinoma gástrico submetidos à análise citofotométrica do ADN. Os padrões de distribuição do ADN foram classificados em baixa e alta ploidia. A razão de alta ploidia foi de 55,7% no grupo com metástase linfonodal, a qual foi considerada estatisticamente significativo quando comparado com 31,5% no grupo negativo para metástase de linfonodos. A ploidia de ADN foi muito bem correlacionada com as metástases ganglionares

regionais e o modo de metástase pareceu ser diferente entre os grupos de alta e baixa ploidia.

KORENAGA, SAITO, BABA, WATANABE, OKAMURA, MAEHARA e SUGIMACHI (1990) analisaram pela citometria de imagem, o conteúdo de ADN e as taxas mitóticas em 37 casos de carcinoma gástrico para identificar o significado biológico das anormalidades de ADN. As metástases linfonodais regionais também foram avaliadas por estes parâmetros. De acordo com a análise de regressão linear, houveram 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. Similarmente, altas taxas mitóticas foram observadas nos tumores com doença metastática. A detecção quantitativa das anormalidades de ADN embasam a informação biológica pertinente para predizer a ocorrência de metástases em pacientes com câncer gástrico.

TSUCHIYA & HOSHINO (1990) estudaram a relação entre as características clínicas e os valores de ploidia nuclear em 80 casos de câncer gástrico. Os valores de ploidia de 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 metástases. Os valores elevados de ploidia de ADN de tumores metastáticos em linfonodos foi significativamente maior do que nas peças gástricas. Identificaram que quando as células do tumor invadem a superfície peritoneal, através da camada serosa, o valor da ploidia nuclear reduz significativamente seu valor, por razões desconhecidas. Concluíram que deve-se ter sempre em mente que a redução dos níveis de ploidia de ADN nuclear nestes tipos invasivos de tumor não significa necessariamente boa evolução clínica. A análise de ploidia nuclear é um meio bastante efetivo para o diagnóstico celular do câncer gástrico.

KUWANO & SUGIMACHI (1990) realizaram a análise citofotométrica 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 um curso pós-operatório tranqüilo e sem recidiva, enquanto 3 de 15 (20%) e 5 de 9 (55,6%) com tipos III e IV, respectivamente, morreram devido a recidivas. A citometria de imagem do ADN utilizando biópsias esofágicas 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.

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 foram considerados aneuplóides. Nos tumores aneuplóides, a incidência de invasão submucosa, invasão vascular e 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, KORENAGA, KAKEJI, ORITA, MAEHARA, SUGIMACHI (1991) estudaram o potencial de crescimento tumoral através da ploidia de ADN em 109 pacientes com câncer gástrico precoce e 132 com carcinoma gástrico avançado. Os carcinomas gástricos precoces foram classificados pelo potencial de crescimento em tipo mucoso pequeno, tipo superficial (super type), expansivamente penetrante (Pen A) ou infiltrativamente penetrante (Pen B). Os carcinomas avançados foram

classificados em funil, colunar ou tipo montanha, sendo que cada um deles foi também dividido em tipos expansivos ou infiltrativos. 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 super type precoce e o tipo funil avançado, caracterizados por crescimento do tipo superficial, obtiveram mais comumente baixa ploidia de ADN. Em contraste, o tipo Pen A precoce e o tipo colunar avançado caracterizaram-se por crescimento expansivo e penetrante e observou-se mais comumente ploidia de ADN elevada.

SAITO, KORENAGA, HARAGUCHI, MAEHARA e SUGIMACHI (1992) investigaram microespectrofotometricamente a ploidia de ADN e a atividade mitótica em 46 pacientes com carcinoma gástrico. As medidas do conteúdo do ADN e o índice mitótico foram examinados 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 valor significativamente maior na serosa, comparada com os 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 (ploidia homogênea de ADN). 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) estudaram a análise do ADN através de parâmetros histomorfométricos em carcinoma gástrico, utilizando-se do sistema de análise de imagem LEITZ (Modular Image Analysis Computer). As peças foram procedentes de ressecções curativas, sendo que 58 eram adenocarcinomas, 24 eram carcinomas

em anel de sinete e 21 carcinomas do tipo indiferenciado. Encontraram correlação entre o conteúdo do ADN e os parâmetros histomorfológicos. 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 ou a idade em nada alteraram o prognóstico.

YONEMURA, MATSUMOTO, NINOMIYA, OHOYAMA, KIMURA, de ALETXABALA, 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 casos eram uniformemente ADN aneuplóides e cada bloco tecidual continha o mesmo índice de ADN. Os outros 45 (69%) variaram no conteúdo heterogêneo de ADN. Em 39 de 45 casos, havia mistura de amostras diplóides e aneuplóides, e 25 de 39 tumores tinham linhagem de aneuploidia simples. Em 14 dos 39, havia também miscelânea de tipos diplóides e aneuplóides possuindo duas ou mais linhagens de aneuploidia de ADN. Em 6 tumores remanescentes, diferentes linhagens aneuplóides de ADN estavam presentes em diferentes amostras sem evidência de diploidia. Quando 4 ou menos casos foram analisados, 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 foram analisadas. Os pacientes com câncer gástrico 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 com neoplasia 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 câncer gástrico para identificar os grupos de pacientes em seus diferentes cursos clínicos e prognósticos.

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 a 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 casos. 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 no câncer avançado. Em qualquer estadiamento da doença, a sobrevida em 5 anos foi 77,4% para os tumores diplóides contra 36% para os aneuplóides.

2.3 CITOMETRIA DE IMAGEM E CITOMETRIA DE FLUXO NO CÂNCER GÁSTRICO – MATERIAL PARAFINADO

DANOVA, MAZZINI, WILSON, UCCI, DIONIGI, RICCARDI e FIOCCA (1987) realizaram a análise de ADN através da citometria de fluxo, comparativamente em material a fresco e parafinado, obtido de biópsias gástricas em 5 pacientes com mucosa histologicamente normal e de 9 outros casos submetidos a gastrectomia radical por câncer gástrico. Analisaram a ploidia e a distribuição de células em suas diferentes fases. Todas as amostras de mucosa normal mostraram conteúdo diplóide modal. Uma distribuição unimodal de ADN foi encontrado tanto no material a fresco como no parafinado, em três casos de adenocarcinoma bem diferenciado, enquanto os seis restantes (1 moderadamente diferenciado, 4 pouco diferenciado e 1 indiferenciado) mostraram aneuploidia. O percentual de células em fase S no tecido normal e nos tumores foi respectivamente 9% e 11,9% no material a fresco e 10% e 15% no material arquivado em blocos de parafina. A atividade proliferativa foi estatisticamente maior nos tumores do que na mucosa normal. A qualidade de citometria de fluxo de ADN de material proveniente de peças parafinadas foi comparado com as originadas de peças a fresco e concluíram que a amostragem

oriunda de material a fresco proporcionaram qualidade de citometria de fluxo melhor às peças originárias de material arquivado em blocos de parafina.

DANOVA, RICCARDI, MAZZINI, WILSON, DIONIGI, BRUGNATELLI, FIOCCA, UCCI, JEMOS e ASCARI (1988) analisaram a citometria de fluxo do ADN em amostras obtidas de material parafinado 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 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 estatisticamente significativa. A aneuploidia foi encontrada em 36,4% dos tumores bem diferenciados (graus I e II) e em 75% dos pouco diferenciado (grau III). A percentagem de células em fase S na mucosa gástrica normal foi menor que nos tumores. O parâmetro aneuplóide de 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.

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 Bromodeuxiuridina 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 pelo 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 um 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 um 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 3 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.

HARAGUCHI, WATANABE, MORIGUCHI, KORENAGA, MAEHARA, OKAMURA, SUGIMACHI (1991) determinaram a ploidia de ADN através da análise citofluorométrica de tecidos emblocados em parafina provenientes de 96 pacientes japoneses portadores de carcinoma gástrico que tinham invadido serosa. Aneuploidia foi encontrada em 63 pacientes (66%). A taxa de sobrevivência pós-operatória de 5 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 significativos e independentes, quando correlacionados com o prognóstico.

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. Os parâmetros 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.

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.

MIZUNUMA, TSUCHIYA, ANDO, KIKUCHI e ABE (1996) objetivaram encontrar se existe alguma correlação entre a aneuploidia de ADN, no câncer gástrico que invade a camada muscular própria e a sobrevida. Para tanto realizaram estudo retrospectivo com 52 pacientes submetidos a 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 uma análise multivariada mostrou que somente a ploidia do DNA 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 o significado clínico 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%). A aneuploidia foi mais frequentemente detectada em tumores com envolvimento submucoso (32,7%) e linfonodos metastáticos (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 frequência 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.

2.4 COLORAÇÃO DE FEULGEN

SCHULTE & WITTEKIND (1989) estudaram a padronização da técnica de FEULGEN. Aplicaram quatro fuccinas análogas em suas formas puras: pararosanilina, rosanilina, magenta II e nova fuccina. A técnica de FEULGEN foi usada em material hepático e núcleos de linfócitos de sangue periférico humano. Concluíram haver igualdade nas fuccinas puras, havendo discrepância naquelas presentes no comércio, devido a variação de pureza das fuccinas e contaminação com agentes fluorescentes. As fuccinas puras são as indicadas para a 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 influem na cromatina. Dos nove fixadores utilizados, o REGAUD (composto por formaldeído e dicromato de potássio), foi considerado o melhor.

SCHULTE (1991) revisou a padronização da reação de FEULGEN para sua utilização na citometria de imagem do ADN. Evidenciou os cuidados a serem tomados na fixação, na hidrólise ácida, nos componentes do reativo de FEULGEN e no material usado nos blocos histológicos. Relata que a reação de FEULGEN deve ser padronizada, e que seu uso rotineiro em laboratórios é possível, para os casos

de proposição diagnóstica e considera sua alta validade para o estudo nuclear em citometria.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

Realizou-se, no presente estudo, a avaliação computadorizada dos parâmetros morfonucleares, densitométricos e de textura da cromatina de células de tumores gástricos humanos, previamente preparados e corados pelo método de FEULGEN, analisados no Instituto de Pesquisas Médicas do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba / Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, balizados em resultados histopatológicos obtidos por análise tradicional de três anátomo-patologistas procedentes de serviços de patologia conceituados em Curitiba/Paraná.

Aplicaram-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, a Nomina Anatomica de 1987, a Nomina Histológica de 1975 e as Normas para apresentação gráfica de dados: tabelas, do Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social – IPARDES, do Governo do Estado do Paraná.

3.1 AMOSTRA

O material de estudo foi constituído por 28 casos de tumores malignos de estômago, fixados em formol e conservados em blocos de parafina. Este material foi proveniente do arquivo do serviço de anátomo-patologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Estado do Paraná e foi obtido de pacientes submetidos à cirurgia de ressecção gástrica, no período de 1992 a 1998.

3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL DESTINADO À ANÁLISE ANATOMO-PATOLÓGICA

Utilizaram-se, inicialmente, 80 blocos de parafina de 68 casos contendo lesões gástricas, com conhecimento prévio de malignidade, do ponto de vista histopatológico, conforme informações de registro do serviço de anátomo-patologia.

3.2.1 Preparo do material histopatológico

Cada bloco de parafina foi submetido a microtomia obtendo-se um fragmento histológico de 5 micra. As lâminas montadas com os fragmentos foram desparafinadas em banhos xilol e hidratadas em banhos de soluções com teores alcoólicos decrescentes até serem submetidos a banhos com água. Utilizou-se para a análise microscópica a coloração da hematoxilina-eosina (MICHALANY, 1980).

As lâminas foram distribuídas para três patologistas, sem que eles tivessem o conhecimento prévio do diagnóstico dado aquele determinado caso , à sua época, bem como não tomaram conhecimento do resultado histopatológico que seus pares haviam dado à cada lâmina, no presente estudo. Os diagnósticos histopatológicos foram assim estabelecidos (ROBBINS & COTRAN, 1983):

a) Quanto ao tipo histológico

a.1) Adenocarcinoma

a.2) Tumores não-epiteliais (linfomas, leiomiossarcomas)

a.3) Outros

b) Quanto ao padrão

b.1) Intestinal

b.2) Difuso

- c) Quanto ao grau
 - c.1) Bem diferenciado
 - c.2) Moderadamente diferenciado
 - c.3) Pouco diferenciado
 - c.4) Indiferenciado

3.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL DESTINADO À ANÁLISE CITOFOTOMÉTRICA

Após a análise histopatológica, foram escolhidos 50 blocos de parafina, baseando-se na quantidade de tecido tumoral presente em cada corte histológico, segundo orientação dos patologistas. O restante do material previamente escolhido apresentava pouco material tumoral, sendo este o motivo de exclusão destas peças no presente estudo.

Realizaram-se cortes histológicos em cada bloco de parafina que continha o espécime de tecido, com espessura de 60 micra. Estes cortes de 60 micra de espessura, foram destinados à análise citofotométrica. Nestes cortes selecionou-se também qual a área tumoral mais representativa, livre de tecidos inflamatórios ou de necrose, sendo esta área adotada para a análise citofotométrica.

Para o processamento citofotométrico da presente metodologia, foi necessário obter a separação dos núcleos celulares dos 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 (formado pelas células tumorais), o qual foi aspirado, filtrado com gaze e depositado em recipiente plástico. Induziu-se a digestão celular acrescentando-se solução de pronase a 0,05%. Finalmente, realizou-se a centrifugação e obteve-se um concentrado de núcleos no fundo do recipiente. Os núcleos celulares foram transferidos, sob pressão, para lâminas de vidro e submetidos à coloração pelo método de FEULGEN (LARSIMONT, KISS, De LAUNOIT e MELAMED, 1990). Para cada caso foram analisados 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 ácido desoxirribonucléico (ADN).

As lâminas com os esfregaços tumorais foram submetidos à coloração seguindo os seguintes passos:

- a) 2 banhos por imersão em água destilada (5 min cada um);
- b) Banho por imersão em ácido clorídrico 6 N (1h);
- c) Banho por imersão água destilada (1min);
- d) Banho por imersão em reativo de SCHIFF (1h);
- e) 3 banhos de imersão em solução de água sulfurosa (5min), a qual é composta de 100 ml 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 99%, isopropanolol (2 etapas) e toluol (3 etapas).

No término deste processo, o conteúdo do ADN dos núcleos de células presentes no esfregaço assumiram coloração vermelho-magenta. Em seguida, as lâminas foram montadas com lamínulas e estocadas em câmara escura até o dia da análise da imagem.

3.5 EQUIPAMENTO COMPUTADORIZADO – O SISTEMA SAMBA 4000

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

3.5.1 Equipamentos componentes

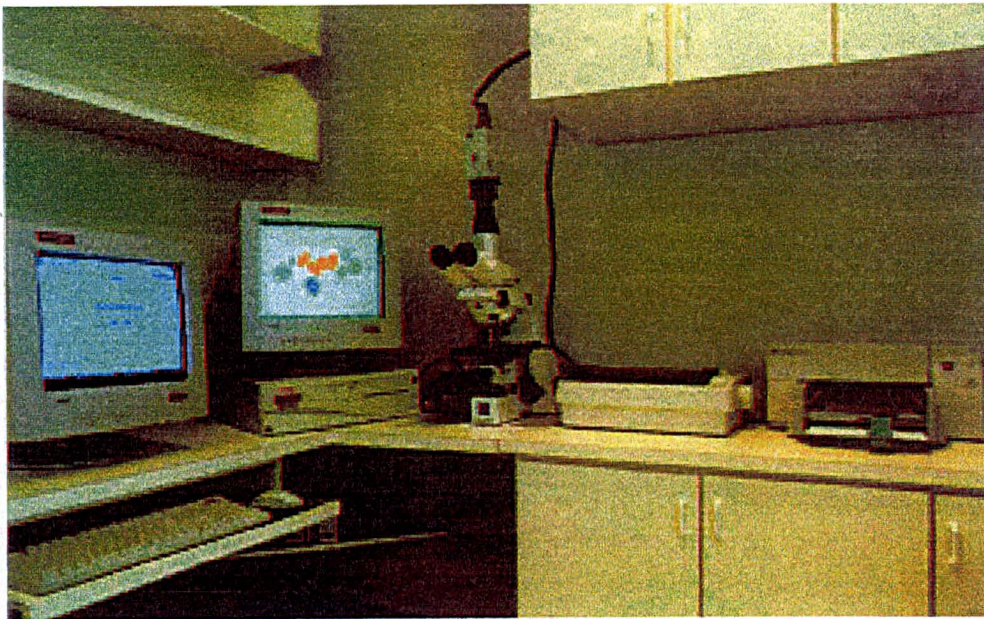
O sistema SAMBA 4000 – *Système d'analyse microscopique à balayage automatique* (Sistema de Análise Microscópica de Busca Automática), fabricado por Alcatel (Grenoble/França), teve sua instalação no Instituto de Pesquisas Médicas –IPEM em 1996. O *hardware* é composto por microscópio, vídeo-câmera, microcomputador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

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 determinado. A imagem captada por fotodiodos, foi transformada em pontos de imagem (pixel), 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



3.5.2 Programa de computador (*Software*)

Este programa tem a finalidade de transformar as imagens do ADN celular corado pela técnica de FEULGEN, capturadas pela vídeo-câmera, em matriz numérica e, a partir desta, calcular parâmetros matemáticos que permitam a comparação dos núcleos entre si (como por exemplo os parâmetros morfonucleares e descritores da taxa de ploidia). Além disto, o programa permite o 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, o que é feito mediante atribuição de graduações de níveis cinza (0 a 255) para cada ponto de imagem. Este processo corresponde à numerização da imagem e envolve duas etapas: geração de matriz em níveis de cinza (figura 2) e transformação desta em matriz numérica binária (figura 3). O valor 0 é conferido para o fundo e o valor 1

para o que for diferente do fundo, o que na citometria de imagem corresponde à lâmina não corada e ao núcleo corado pelo vermelho-magenta do método de FEULGEN, respectivamente. Pode-se observar o resultado final deste processo na figura 3.

A obtenção destes dados foi realizada automaticamente pelo programa do sistema SAMBA 4000.

Figura 2 - Ilustração do processo de numerização da imagem em níveis de cinza de um núcleo celular. 0 = pontos de imagem sem densidade; parte numérica = pontos de imagem com densidade em níveis de cinza, representando um núcleo celular. A somatória destes pontos representa a densidade óptica integrada

```

000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
0000000000000000 25 205 145 36 255 1 00000000000000000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000 26 35 41 61 78 105 253 142 25 000000000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000 3 55 43 24 102 200 203 200 20 35 000000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000 35 23 81 17 86 95 78 105 141 204 35 00000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000 23 96 118 35 49 46 92 76 66 45 26 00000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000101 76 55 66 85 94 36 48 254 000000000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000011 118 16 35 42 56 89 00000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000251 35 51 86 000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000

```

Os valores de cinza atribuídos pelo computador podem identificar estruturas nucleares. Da mesma forma, pode-se identificar regiões hipo e hiper cromáticas. Valores inferiores a 64, caracterizam regiões pálidas; entre 64 e 128, pouco densas; entre 128 e 192 moderadamente densas; e com valores superiores a 192, são consideradas hiper cromáticas (SALMON, 1993).

Figura 3 - Imagem binária (matriz numérica binária). Cada conjunto de pontos-imagem 1, representa um núcleo celular. A ausência de núcleo (ponto de imagem sem densidade) corresponde ao valor 0.

```
0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000001111110000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000111111111100000000000000000000000000000000000000000000000000000000
000001111111111111000000000000000000000000000000000000000000000000000000
000001111111111100000000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000011111110000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000001110000000000111111100000000000000000000000000000000000000000000
000000000100000000011111111100000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000111111111110000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000111111111111110000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000011110000000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000111100011100000000000000000000000000000000000000000
000000000000111111110000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000000011111111110000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000000011111111110000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000000011111000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
```

3.6 PROCEDIMENTO DE LEITURA

A leitura dos resultados foi realizado mediante técnica de citometria de imagem do ADN. Utilizou-se o sistema SAMBA 4000, composto por *software* e *hardware* específicos já referidos.

A calibragem do sistema SAMBA 4000 deve ser realizada individualmente, para a leitura de cada uma das lâminas. A calibragem obedece a três etapas 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 20x. 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 é estudada segundo a técnica de varredura por campos em barra grega. Realiza-se a seleção individual de núcleos tumorais malignos íntegros, diferenciando-se de núcleos sobrepostos, linfócitos, restos nucleares e artefatos. Em cada campo são analisados entre 1 e 5 núcleos, na dependência da distribuição dos núcleos do esfregaço; após a leitura de cada campo, os resultados são armazenados cumulativamente em diretório específico (identificação de amostra tumoral). No término do estudo de cada amostra, objetiva-se a captação ideal das imagens de pelo menos 200 núcleos tumorais.

Ao final 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.

3.7 PARÂMETROS MATEMÁTICOS CALCULADOS PELO COMPUTADOR

Seguindo o princípio de segmentação e numerização da imagem, a análise de cada núcleo celular permitirá o cálculo de 3 diferentes parâmetros, utilizados nesta pesquisa. A base para a identificação e cálculo destes parâmetros é a densidade

óptica de cada ponto de imagem. Os parâmetros são numerados de 1 a 15 e identificados pelo símbolo #.

As células eucariontes (células com um núcleo verdadeiro), caracterizam-se por um envoltório nuclear (membrana nuclear) que separa o núcleo das outras estruturas celulares que se encontram no citoplasma. Sua função primordial é o armazenamento do conteúdo de ácido desoxirribonucléico, o ADN celular, e servir de local para a síntese e a duplicação protéica no processo de divisão celular. Ao contrário do citoplasma que pode apresentar especializações específicas para determinada função, o núcleo apresenta, com raras exceções, basicamente funções e estrutura interna constantes.

O período em que o núcleo não se encontra em divisão chama-se interfase, apresentando características particulares. Quando se observa, através da microscopia óptica, um núcleo celular corado pelo método da hematoxilina-eosina, pode-se identificar um delgado envoltório azul-púrpura que o delimita, denominado membrana nuclear. No seu interior encontra-se uma ou mais massas, intensamente azuladas, (pela grande concentração de ácidos nucléicos) que são os nucléolos, assim como agregados menores e menos arredondados, que caracterizam a cromatina. A cromatina pode apresentar-se condensada, em forma de grânulos (heterocromatina) ou não condensada, sendo então desespiralizada (eucromatina), forma esta, não percebida à microscopia óptica.

O termo cromatina é usado para um material basófilo complexo do qual são compostos os cromossomas. Além de seu componente genético (ADN), possui grupos de proteínas associadas ao ADN, denominadas histonas, material protéico não-histonas e quantidades variáveis de ARN (ácido ribonucléico) transcrito do ADN. Um dos papéis dessas unidades protéicas é o de conferir diferentes estágios de organização estrutural e funcional à cromatina. A transcrição gênica ocorre a partir da eucromatina. A heterocromatina representa 90% da cromatina quando a célula não se encontra na fase de síntese de ADN.

A heterocromatina pode ser constitutiva (representando o centrômero, sem função na transcrição gênica) ou facultativa, que possui genes inativos, também sem função de transcrição, na interfase. Os genes da heterocromatina facultativa

são inativados de maneira seletiva, variando em diferentes tipos celulares, fato que pode ser observado pela microscopia óptica, em células, na interfase.

Alterações neste padrão gênico requerem o desdobramento seletivo dos genes, anteriormente inativos na heterocromatina, revertendo processos da condensação da cromatina. Permitem que o mesmo conteúdo gênico seja expresso de diferentes maneiras. Estas alterações da expressão gênica, em células especializadas típicas, é denominada diferenciação celular. Quando observadas pelos patologistas originaram diferentes classificações histológicas. A citofotometria analisa o padrão de transcrição gênica, específica de cada população tumoral, através do cálculo de diferentes parâmetros que serão descritos a seguir.

O ciclo celular caracteriza-se por uma seqüência de eventos que é repetida, várias vezes, na mesma ordem. Este ciclo baseia-se, essencialmente, em duas fases: a mitose e a interfase. A interfase é o intervalo entre duas fases consecutivas de mitose e é quando as células desempenham suas funções especializadas. A fase em que ocorre a duplicação do ADN é denominada de fase S (fase de síntese). O intervalo que há entre o final da mitose e a fase de síntese denomina-se fase G1 (do inglês G de *gap*), e o intervalo entre o início da fase S e o início da mitose é denominado G2. Assim o ciclo celular é constituído de quatro etapas M, G1, S e G2.

Certos tipos celulares em interfase podem ser capazes de sair do ciclo celular quando em fase G1 por um período indefinido, sem se especializarem. Este estado pode ser considerado como um estado de reserva não cíclico, ou fase G0, estado celular não-proliferante. Porém, seguindo certos estímulos, estas células retornam ao ciclo na fase G1. Desta forma poder-se-ia admitir uma quinta etapa do ciclo celular que seguiria esta seqüência M, G0-G1, S e G2.

3.7.1 Parâmetros ligados à morfologia do núcleo celular

Vários parâmetros existem para descrever a forma do núcleo celular. Pode-se descrever a forma do núcleo utilizando-se o parâmetro do perímetro quadrado pela superfície (BRUGAL, GARBAY, GIROUD e ADHEL, 1979), ou também, pela medida

de seu maior comprimento (BAAK, KURVER, De SNOO-NIEWLAT, De GRAEF, MAKKINK e BONN, 1982).

No presente estudo, apenas um parâmetro foi utilizado para definir a morfologia nuclear que é a "área nuclear" (**NA = #1**). Corresponde à somatória do número de pontos-imagem ocupada pela superfície nuclear.

3.7.2 Parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular

Considera-se como densitométricos apenas os parâmetros que permitem a avaliação da quantidade de ADN nuclear. São em número de dois: a densidade óptica integrada (**DOI = # 2**) e a densidade óptica média (**DOM = # 3**). A densidade óptica média (**DOM**), que significa o valor médio da densidade óptica de todos os pontos de imagem do núcleo, não foi utilizada nesta pesquisa.

3.7.3 Parâmetros ligados à textura, à organização e à distribuição da cromatina nuclear

As particularidades organizacionais da cromatina nuclear e de sua textura são de reconhecida importância. Na presente metodologia descreve-se 12 parâmetros morfonucleares derivados das faces da cromatina, ou seja, do aspecto revelado através dos cálculos matemáticos que descrevem a hetero e a eucromatina. Utiliza-se o vocábulo face para descrever a aparência da imagem nuclear, obtida através dos cálculos matemáticos.

Estes parâmetros pertencem a três grupos distintos:

3.7.3.1 Parâmetros extraídos do histograma dos valores das densidades ópticas

Um histograma é a tradução gráfica das diferentes intensidades de densidade óptica integrada (**DOI = # 2**) de determinada população tumoral, expressa em unidades relativas, dispostas em 200 classes distintas de diferentes níveis de densidade óptica.

Três parâmetros pertencem a este grupo: o Índice de Skewness (**SK = # 4**), a Variação da densidade óptica (**VOD = # 5**) e o Índice de Kurtosis ou Curtose (**K = # 6**). Estes parâmetros irão nos informar sobre o **aspecto homogêneo ou heterogêneo** do núcleo celular (existência da eucromatina e heterocromatina).

O parâmetro SK representa a simetria da distribuição dos valores da densidade óptica. O valor atribuído a cada ponto-imagem varia de 1 a 256, o valor médio da densidade óptica é de 128. Portanto, um valor negativo de SK representa um histograma com simetria tendendo para a esquerda em relação à média. Isto demonstra um núcleo, globalmente pálido. Um valor de SK positivo representa uma maioria de pontos-imagem com densidade óptica superior a 128 e o núcleo será globalmente denso. Quando o valor de SK tender para 0, isto representa uma proporção similar de pontos-imagem densos e pálidos.

A variância da densidade óptica, VOD, descreve, quantitativamente, a distribuição dos níveis de densidade óptica nuclear. Este parâmetro fornece informações qualitativas sobre o nível de heterogeneidade da densidade óptica. Os valores de VOD indicam a organização da distribuição da densidade óptica, sendo esta, então, ordenada ou desordenada. (GIROUD, 1987; COLOMB, KOPP, SPYRATOS e MARTINS, 1989; ETIEVAN, KUCZYNSKI, PAUWELS e KISS, 1991; VAN VELTHOVEN, PETEIN, ZLOTTA, OOSTERLINCK, VAN DER MEIDJEN, ZANDONA, ROELS, PASTEELS, SCHULMAN e KISS, 1994).

O parâmetro K mede a homogeneidade da distribuição da densidade óptica no núcleo, ajudando na determinação do aplainamento do histograma. O seu valor amplia-se consoante a grandeza do pico do histograma e a pequenez da base, o que traduz o aumento da homogeneidade nos graus de condensação da cromatina. Portanto, quanto menor o valor de K (histograma aplainado), mais os valores de densidade óptica do núcleo são variáveis e mais o núcleo parece heterogêneo, sendo o inverso verdadeiro. Portanto, combinando-se os parâmetros SK e K descreve-se o núcleo como sendo homogeneamente pálido ou denso.

3.7.3.2 Parâmetros obtidos das matrizes de comprimento das secções

Define-se secção como um conjunto de pontos consecutivos de níveis semelhantes de IOD.

Correspondem, essencialmente, a descrição da face cromatiniana em termos de frequência de aparição de curtas e longas secções de cromatina nuclear. São cinco os parâmetros a saber: a frequência de curtas secções de cromatina (**SRL = # 7**), a frequência de longas secções de cromatina (**LRL = # 8**), a distribuição dos níveis de cinza nuclear (**GLD = # 9**), sua distribuição (**RLD = # 10**) e sua porcentagem (**RLP = # 11**). Parâmetros descritos por GALLOWAY (1975) descrevem, principalmente, o **aspecto granular do núcleo** (condensação da heterocromatina). O parâmetro SRL representa a frequência dos pequenos grupamentos de cromatina dentro do núcleo; o parâmetro LRL representa os grupamentos de cromatina com textura grosseira; os parâmetros RLP e GLP representam a distribuição dos níveis de intensidade de imagem, a não uniformidade da distribuição dos comprimentos de secção.

3.7.3.3 Parâmetros obtidos da matriz de co-ocorrência

São quatro os parâmetros texturais deste grupo: a média local (**LM = # 12**), a Energia (**E = # 13**), o Coeficiente de Variação (**CV = # 14**), e o Contraste (**C = # 15**). Indicam os **graus de condensação global da cromatina** (hetero e eucromatina). Foram descritos por HARALICK, 1973.

O parâmetro LM mede o nível de intensidade média do núcleo ou de uma de suas regiões. Seus valores aumentam em função do número de pontos-imagem com valores altos de densidade óptica (>170).

Os parâmetros E e CV traduzem a uniformidade dos níveis de intensidade de imagem. O parâmetro E representa a proporção de áreas pálidas no núcleo, como as descritas por valores de densidade óptica menores que 70. Os valores de E aumentam com o aumento do número de áreas pálidas no núcleo.

O parâmetro C mede regiões nucleares de intensidade de imagem diferentes. Seus valores diminuem quando o núcleo possui poucas regiões com longas secções de cromatina (LRL).

3.7.4 Tipagem do histograma do ADN

A tipagem do histograma do ADN deriva da análise da densidade óptica integrada e para se obter histograma de perfeita resolução é suficiente que se faça a numerização da imagem, no mínimo, de 200 núcleos celulares. O histograma do ADN celular será classificado de acordo com o valor da ploidia do pico G0-G1 da população celular. Cada histograma é subdividido em 50 classes de 200 unidades relativas de DOI, conforme KISS e cols. em 1992.

Nos casos de populações celulares com conteúdo de ADN puro são reconhecidos seis tipos de histogramas diferentes: diplóides, hiperdiplóides, triplóides, hipertriplóides, tetraplóides e aneuplóides (ou polimorfo). Quando as populações celulares apresentam taxas de ADN mistas, ou seja, picos de G0-G1 vários ou intercalados, os histogramas são ditos aneuplóides ou polimorfos. Os histogramas são caracterizados da seguinte forma:

Diplóide: Tipo I - quando o pico G0-G1 estiver em torno de $2c$ (c = quantidade de ADN em linguagem matemática);

Hiperdiplóide: Tipo IV - quando o pico de G0-G1 estiver em torno de $2,5c$;

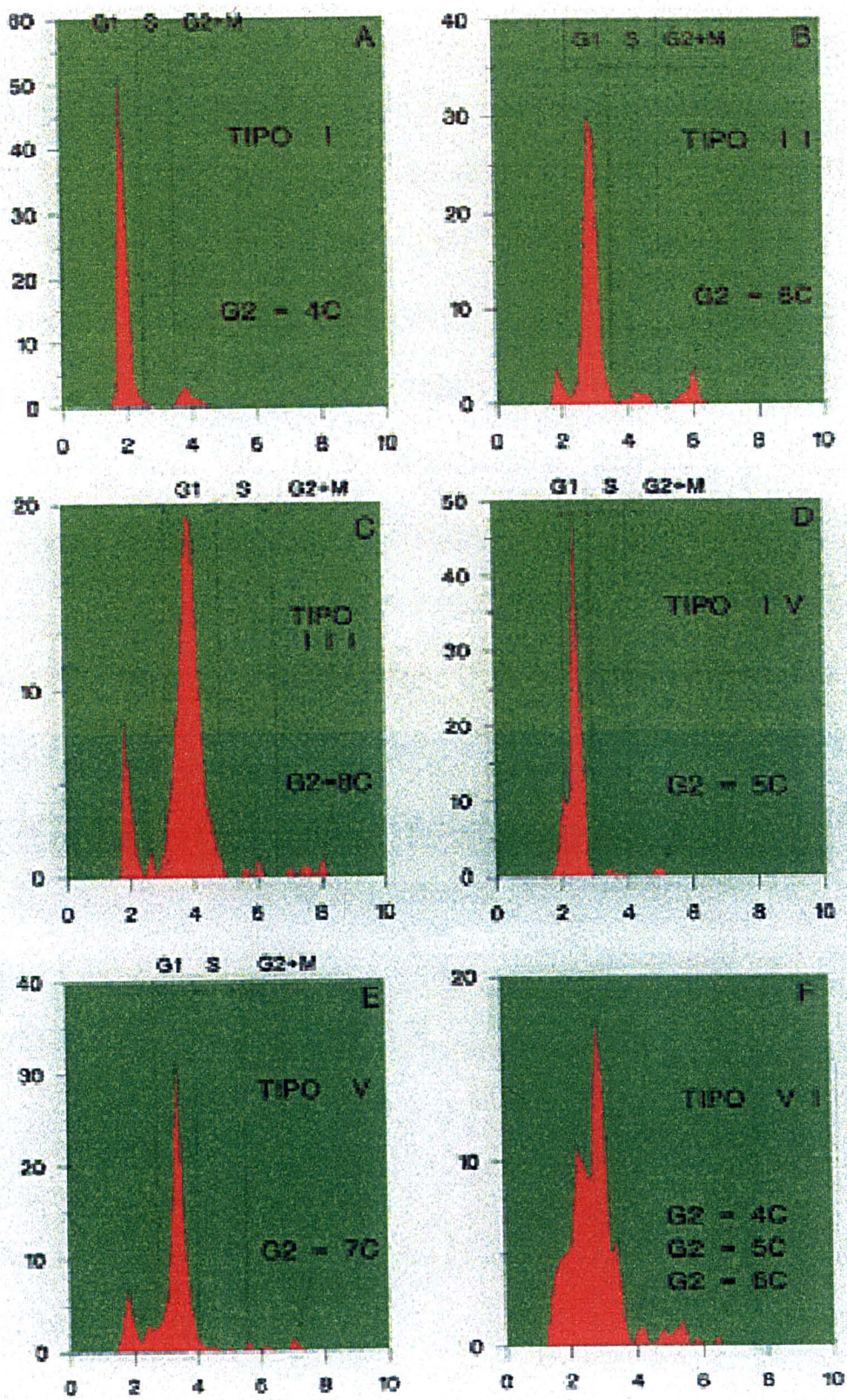
Triplóide: Tipo II - quando o pico G0-G1 estiver em torno de $3c$;

Hipertriplóide: Tipo V - quando o pico G0-G1 estiver em torno de $3,5c$;

Tetraplóide - Tipo III - quando o pico G0-G1 estiver em torno de $4c$;

Aneuplóide ou polimorfo - Tipo VI - quando os picos G0-G1 são vários ou intercalados.

Figura 4 - Exemplos gráficos dos seis histogramas do ADN com os respectivos picos G0-G1 (KISS, 1989)



3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística permitida pelo SAMBA 4000 inclui o estudo monovariado e multivariado. No presente estudo foi realizado o estudo monovariado.

3.8.1 Análise monovariada

Os resultados (apresentados sob a forma de médias, mais ou menos os seus erros padrões), foram comparados entre si pelo teste de análise das variâncias, verificando-se as seguintes condições de aplicação:

- a) As amostras devem ser extraídas de maneira aleatória e independente;
- b) As amostras devem ser divididas segundo a distribuição normal, comparando-se a distribuição de cada amostra e a distribuição teórica da normal. O teste do qui-quadrado permite verificar se elas são estatisticamente diferentes. Se as condições de aplicabilidade deste teste não estão falsamente preenchidas por número suficiente de graus de liberdade, é então utilizado teste de KOLMOGOROV-SMIRNOFF, que é menos exigente;
- c) As variâncias devem ser iguais e duas possibilidades se apresentarão: ou as amostras são iguais, caso em que se utiliza o teste de HARTLEY, que divide as duas variâncias, ou as amostras são diferentes, caso em que se utiliza o teste de BARTLETT.

O teste de FISCHER foi utilizado com base na distribuição F de FISCHER.

No presente trabalho um resultado será considerado estatisticamente significativo, quando p for menor que 0,05 ou 5%. Neste caso, irá se rejeitar a hipótese de nulidade. Valores significativos serão identificados com o símbolo (*).

Estes testes foram realizados com o *software* do sistema SAMBA 4000.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos através da análise histopatológica consideraram o tipo histológico, o padrão e o grau de diferenciação dos casos analisados. A análise da imagem do ADN das populações de tumores gástricos em estudo consideraram o resultado da avaliação da ploidia tumoral, a avaliação dos parâmetros morfométricos, densitométricos, texturais (nos casos com significância estatística) e a análise monovariada.

4.1 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A análise histopatológica dos tumores gástricos deu-se conforme evidenciado na tabela a seguir.

Tabela 1 – Análise histopatológica dos tumores gástricos

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

A = Adenocarcinoma

I = Intestinal

D = Difuso

MOD = Moderadamente diferenciado;

POUCO = Pouco diferenciado; BEM = Bem diferenciado

Todos os 28 casos apresentados foram avaliados como sendo do tipo adenocarcinoma, não havendo discordância entre os 3 patologistas.

Nenhuma observação foi considerada pelos patologistas como sendo indiferenciado em seu grau de diferenciação.

As observações 4, 9 e 28 foram consideradas com padrão intestinal pelo terceiro patologista, diferindo dos dois primeiros que consideraram-nas padrão difuso. Portanto não houve concordância diagnóstica, em relação ao padrão histológico, em 10,7% da amostra.

A obs. 2 foi considerada pelo terceiro patologista com grau de diferenciação moderado e, pouco diferenciado pelo 1º e 2º patologista. Também houve discordância na obs. 16, considerada por aquele patologista, moderadamente diferenciado e os patologistas 1 e 2 como sendo bem diferenciado.

As observações 12 e 24 tiveram o diagnóstico histopatológico de pouco diferenciado pelo patologista nº 2 enquanto os outros consideraram estas peças como sendo moderadamente diferenciados. O segundo patologista também discordou na análise da obs. 23, considerando-a moderadamente diferenciado e sendo avaliada pelos demais como pouco diferenciado.

O patologista nº 1 diagnosticou o grau de diferenciação da obs. 25 como pouco diferenciado e os patologistas 2 e 3 consideraram-na moderadamente diferenciado.

Obteve-se portanto, como resultado histopatológico do grau de diferenciação tumoral, discordância diagnóstica em 6 da 28 observações, ou seja, 21,4 % da casuística.

Não houveram discordâncias referentes ao tipo, padrão e grau de diferenciação das demais observações.

Nos casos em que não ocorreu unanimidade no diagnóstico histopatológico, considerou-se a hipótese descrita pela maioria dos patologistas, com a finalidade de balizar os parâmetros matemáticos calculados pelo computador, estudados neste ensaio.

4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MATEMÁTICOS CALCULADOS PELO COMPUTADOR

Foram contemplados na análise dos resultados dos parâmetros matemáticos, apenas aqueles cujo valor de “p” do estudo estatístico F de Fischer foi significativo.

4.2.1 Parâmetros ligados à morfologia do núcleo celular

O parâmetro # 1, também denominado área nuclear, não apresentou resultado estatístico significativo quando comparados os padrões histológicos intestinal e difuso de tumor gástrico maligno. Porém, quando confrontados os graus de diferenciação “moderadamente e bem diferenciado”, pôde-se observar um resultado de “p” igual a 0,035. O cruzamento entre os demais graus de diferenciação (moderadamente X pouco diferenciado; bem X pouco diferenciado) não evidenciou resultado significativo, do ponto de vista estatístico. O resumo destes resultados pode ser evidenciado na tabela 2.

Tabela 2 - Correlação entre os graus de diferenciação e o padrão histológico e o resultado do parâmetro # 1

Padrão histológico e graus de diferenciação	p
Intestinal X difuso	0,652
Bem X pouco	0,354
Moderadamente X pouco	0,303
Bem X moderadamente	0,035*

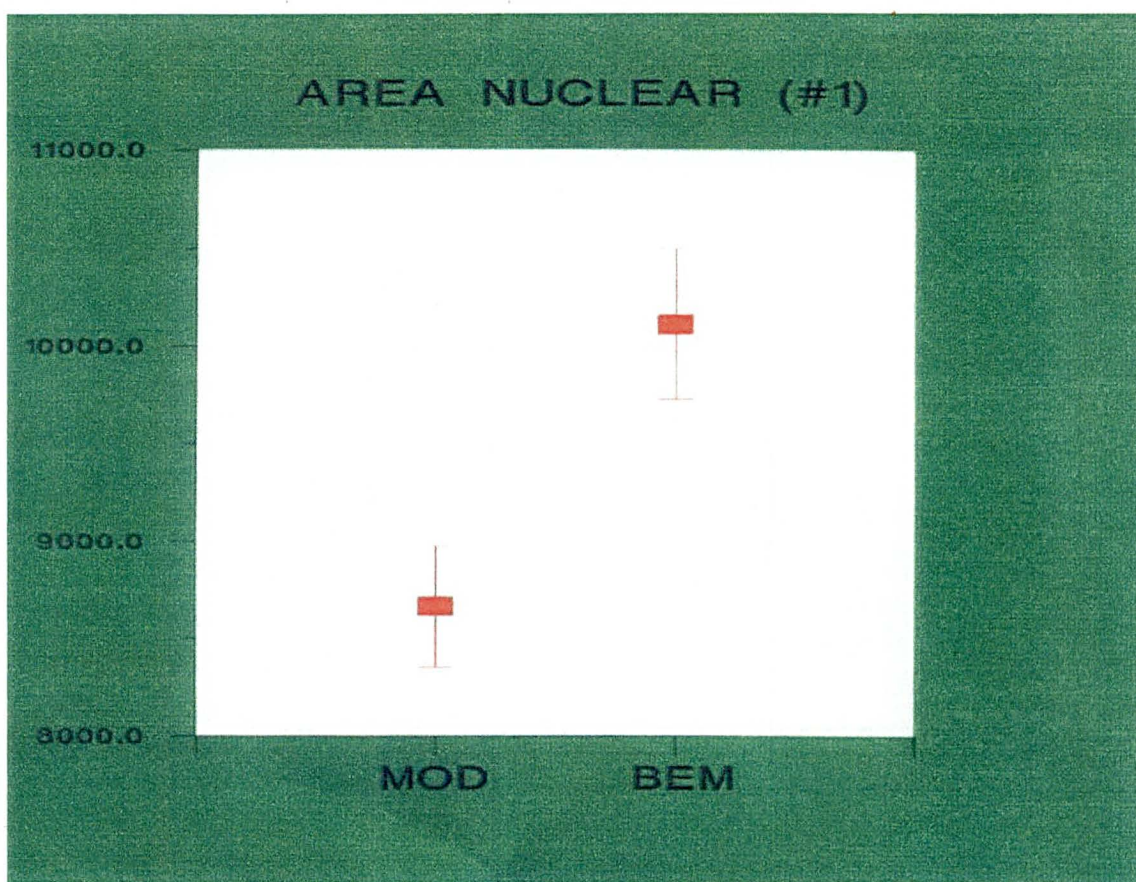
A média do cálculo da área nuclear (# 1) foi de 8.654 pontos de imagem, com desvio padrão de 999 nos casos moderadamente diferenciados e de 10.111 pontos de imagens e desvio padrão de 545, nas amostras consideradas bem diferenciado. O valor do erro padrão foi 316,13 para os “moderadamente” e 386,52 para os “bem” diferenciados. A tabela 3 demonstra o resumo destes resultados.

Tabela 3 - Valores da média, desvio e erro padrão dos casos moderadamente e bem diferenciados, em relação ao parâmetro # 1 (área nuclear)

Grau de diferenciação	média	desvio padrão	erro padrão
Moderadamente	8654	999	316,13
Bem	10111	545	386,52

O gráfico 1 ilustra o valor médio e o erro padrão da área nuclear no cruzamento dos graus moderadamente e bem diferenciado.

Gráfico 1 – Média +/- erro padrão da média da área nuclear (# 1) na análise dos casos moderadamente (MOD) e bem diferenciado (BEM)



4.2.2 Parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular

O parâmetro # 2 (densidade óptica integrada) não apresentou resultados estatisticamente significativos quando efetuou-se o cruzamento entre os padrões histológicos intestinal X difuso, nem entre os três graus de diferenciação avaliados neste estudo.

4.2.3 Parâmetros ligados à textura, à organização e à distribuição da cromatina nuclear

4.2.3.1 Parâmetros extraídos do histograma dos valores das densidades ópticas

O resultado estatístico dos três parâmetros pertencentes a este grupo podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4 - Correlação entre os graus de diferenciação e o padrão histológico e o resultado estatístico dos parâmetros # 4 (VOD), # 5 (SK), # 6 (K)

Padrão histológico e graus de diferenciação	p		
	# 4	# 5	#6
Intestinal X difuso	0,578	0,932	0,155
Bem X pouco	0,523	0,200	0,519
Moderadamente X pouco	0,056	0,888	0,030*
Bem X moderadamente	0,088	0,394	0,024*

Com base nestes dados, pode-se notar que houve significância estatística no índice de Curtose (# 6) quando confrontou-se os graus “moderadamente e pouco” e “bem e moderadamente” diferenciados.

As tabelas 5 e 6 destacam, respectivamente, os valores da média, desvio e erro padrão dos casos “moderadamente X bem” e “pouco X moderadamente”, referentes ao parâmetro do índice de Curtose (# 6).

Tabela 5 - Valores da média, desvio e erro padrão dos casos moderadamente e bem diferenciados, em relação ao parâmetro # 6

Grau de diferenciação	média	desvio padrão	erro padrão
Moderadamente	491	111	35,44
Bem	691	146	103,54

Tabela 6 - Valores da média, desvio e erro padrão dos casos pouco e moderadamente diferenciados, em relação ao parâmetro # 6

Grau de diferenciação	média	desvio padrão	erro padrão
Pouco	624	161	44,7
Moderadamente	491	111	35,4

O gráfico 2 ilustra a média e o erro padrão retratado na tabela 5, bem como o gráfico 3 demonstra a média e o erro padrão dos dados descritos na tabela 6.

Gráfico 2 – Média +/- erro padrão da média do coeficiente de Curtose (# 6)
na análise dos casos moderadamente (MOD) e bem diferenciado (BEM)

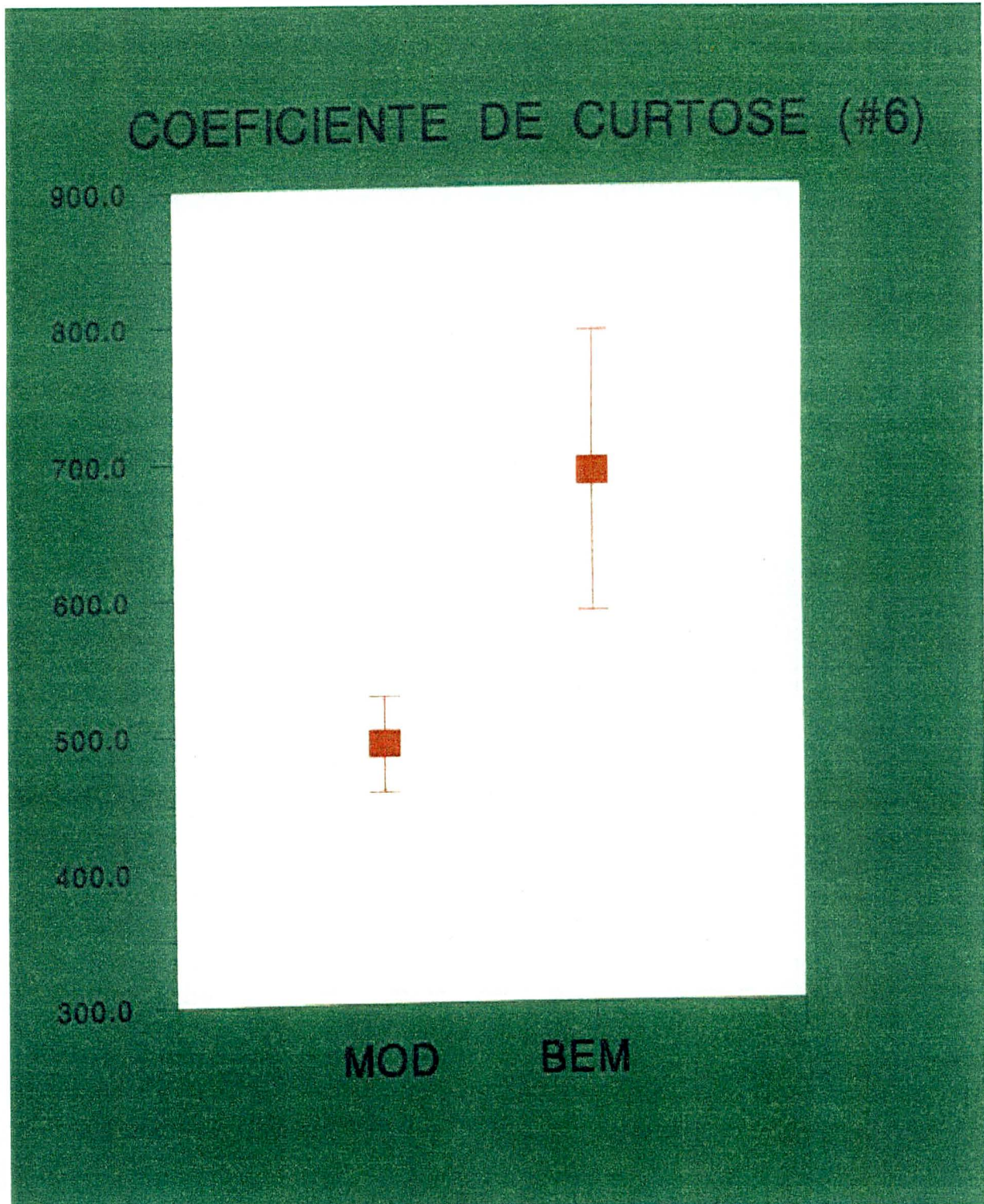
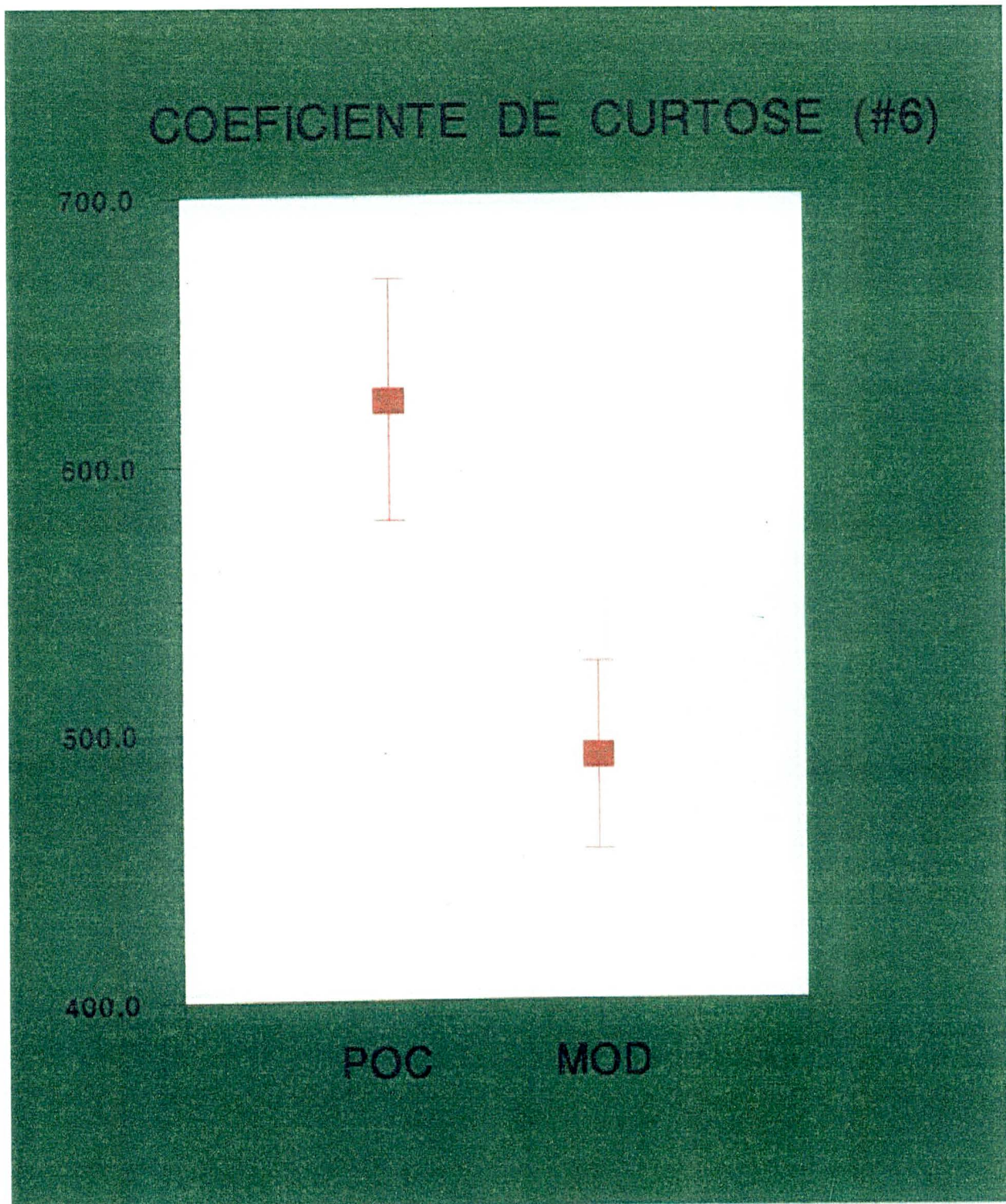


Gráfico 3 – Média +/- erro padrão da média do coeficiente de Curtose (# 6)
na análise dos casos pouco (POC) e moderadamente diferenciado (MOD)



Os resultados dos parâmetros de variância das densidades ópticas (# 4) e índice de Skewness (# 5) não apresentaram resultado de “p” significativo estatisticamente.

4.2.3.2 Parâmetros obtidos das matrizes de comprimento das secções

Os cinco parâmetros pertencentes a este grupo obtiveram o resultado estatístico na análise monovariada destacado na tabela 7.

Tabela 7 - Correlação entre os graus de diferenciação e o padrão histológico e o resultado estatístico dos parâmetros # 7 (SRL), # 8 (LRL), # 9 (RLP), # 10 (GLD), # 11 (RLD)

Padrão histológico e graus de diferenciação	p				
	# 7	# 8	# 9	# 10	# 11
Intestinal X difuso	0,986	0,820	0,686	0,111	0,532
Bem X pouco	0,549	0,797	0,480	0,220	0,524
Mod. X pouco	0,457	0,374	0,496	0,758	0,515
Bem X mod.	0,996	0,759	0,894	0,446	0,932

Mod. = moderadamente; SRL = frequência de curtas secções; LRL = frequência de longas secções; RLP = Porcentagem de secções; GLD = distribuição dos níveis de intensidade; RLD = Distribuição dos comprimentos de secção

Em nenhum parâmetro observou-se o resultado de “p” do estudo estatístico F de Fischer como sendo menor ou igual a 0,05.

4.2.3.3 Parâmetros obtidos da matriz de co-ocorrência

Quatro parâmetros são pertencentes a este grupo, que indicam os graus de condensação global da cromatina. Os resultados podem ser observados na tabela a seguir:

Tabela 8 - Correlação entre os graus de diferenciação e o padrão histológico e o resultado estatístico dos parâmetros # 12 (LM), # 13 (E), # 14 (CV), # 15 (C)

Padrão histológico e graus de diferenciação	p			
	# 12	# 13	# 14	# 15
Intestinal X difuso	0,797	0,953	0,959	0,842
Bem X pouco	0,134	0,264	0,259	0,444
Mod. X pouco	0,538	0,669	0,694	0,446
Bem X mod.	0,169	0,604	0,572	0,867

Mod. = moderadamente; LM = média local; E = energia; CV = variância dos coeficientes da matriz; C = contraste

Estes parâmetros não apresentaram, no cruzamento da amostra estudada, resultados estatísticos com "p" menor ou igual a 0,05.

4.3 TIPAGEM DO HISTOGRAMA DO ADN

A avaliação da tipagem do histograma ADN das células de tumores gástricos estudadas, segundo o parâmetro IOD (densidade óptica integrada), foram detectadas conforme descrito a seguir.

Em relação aos padrões histológicos intestinal e difuso, os resultados avaliados demonstraram, no padrão intestinal, 11 casos considerados diplóides, 1 caso hiperdiplóide, 3 casos hipetriplóide e 1 considerado aneuplóide ou polimorfo. Não foi constatado nenhum histograma do tipo triplóide ou tetraplóide. No padrão difuso a análise detectou 7 casos do tipo diplóide, 2 tetraplóide, 1 caso do tipo hiperdiplóide e 1 aneuplóide ou polimorfo. Não foram encontrados casos com histograma do tipo triplóide ou hipertriplóide. A correlação dos padrões histológicos e os tipos de histograma de ADN encontra-se resumida na tabela 9.

Tabela 9 - Correlação entre os padrões histológicos e tipos de histogramas de ácido desoxirribonucleico (ADN) dos tumores gástricos estudados

Padrão histológico	n	Tipo de Histograma de ADN					
		I	II	III	IV	V	VI
Intestinal	17	11	0	0	1	3	2
Difuso	11	7	0	2	1	0	1

n = número amostral; I = diplóide; II = triplóide; III = tetraplóide; IV = hiperdiplóide; V = hipertriplóide; VI = aneuplóide ou polimorfo.

Ao ser comparado os graus de diferenciação tumoral (bem, moderadamente e pouco diferenciado) em relação aos tipos de histograma o estudo revelou que nos três casos considerados bem diferenciado o único tipo de histograma de ADN encontrado foi o diplóide. Nos casos moderadamente diferenciados a variação foi maior, sendo 7 casos do tipo diplóide, 1 hiperdiplóide, 2 hipertriplóides e 1 do tipo

aneuplóide ou polimorfo. Nenhum caso triploide ou tetraploide foi detectado neste grau de diferenciação. Em relação aos casos aonde o exame anatomo-patológico identificou o grau de diferenciação pouco diferenciado, encontrou-se a seguinte composição: 8 casos diplóides, 2 do tipo tetraploide, 1 hiperdiplóide, 1 hipertriploide e 2 casos considerados aneuplóides. Na tabela 10 encontra-se o resumo da correlação dos casos, cruzando-se o grau de diferenciação histológica e os tipos do histograma do ADN.

Tabela 10 - Correlação entre os graus de diferenciação na avaliação histológica e tipos de histogramas de ácido desoxirribonucléico (ADN) dos tumores gástricos estudados

Graus de diferenciação	n	Tipo de Histograma de ADN					
		I	II	III	IV	V	VI
Bem diferenciado	3	3	0	0	0	0	0
Moderadamente	11	7	0	0	1	2	1
Pouco diferenciado	14	8	0	2	1	1	2

n = número amostral; I = diplóide; II = triploide; III = tetraploide; IV = hiperdiplóide; V = hipertriploide; VI = aneuplóide ou polimorfo.

5 DISCUSSÃO

5.1 DA ESCOLHA DA CITOMETRIA DE IMAGEM

A ciência da anatomia patológica em muito tem evoluído em seus diversos campos, inclusive no que tange à classificações patológicas que têm sido descritas e modificadas no intuito de caracterizar e prever a evolução do comportamento tumoral, com suas repercussões clínicas, prognóstico e tratamento. Estas classificações, entretanto, correm o risco de sofrer uma série extensa de variáveis, muitas vezes não contempladas quando da edição das mesmas, tais como a técnica artesanal na confecção do material anátomo-patológico, a diferenciação do ensino da anátomo-patologia, a labilidade dos anátomo-patologistas, ou seja fatores que pertencem à dificuldade de caracterização do tipo celular primordial ou pela subjetividade dos parâmetros utilizados. Isto contribui sobremaneira para concluir-se sobre a real classificação de determinadas lesões. GASPERIN JR. (1998) cita que 80% das peças histológicas de um laboratório de patologia podem ser identificadas pelo patologista, de forma segura, acerca de sua malignidade ou não. Porém, nos 20% que permaneceram as dúvidas, a análise citométrica do ADN pode ser de grande utilidade no afastamento do caráter subjetivo da interpretação morfológica do patologista. Há algum tempo tem se estudado o conteúdo de ADN nuclear, sua organização e sua textura, como instrumento de auxílio às classificações histológicas, pela análise patológica tradicional e, mais modernamente, através de duas metodologias que utilizam os recursos proporcionados pela informática: a citometria de fluxo e a citofotometria ou análise computadorizada da imagem nuclear. Se por exemplo detecta-se, à citometria de imagem, um padrão nuclear

aneuplóide, a característica maligna da lesão está praticamente decretada, com fortes indícios de alto grau de agressividade (metástase). A dúvida nos 20% de casos, deixa seu espaço para certezas maiores, prognósticos e passos iniciais para a terapêutica.

As metodologias 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 um nível de desenvolvimento superior ao da informática (KATEMENSKI & MELAMED, 1967). A citometria de fluxo apresentava vantagem pelo maior número de células analisadas e pela rapidez da execução. Porém, o problema do material contaminante da amostra, ou seja, a existência de outros tipos celulares (do tecido conjuntivo e células inflamatórias) e material não celular, comumente prejudicava a resolução dos histogramas, interferindo na determinação mais precisa da ploidia da amostragem. Tal problema era devido ao fato de não haver controle da população celular em suspensão a ser analisada. Com o avanço proporcionado por HEDLEY, através da utilização de material de arquivo, e mais modernamente, com o desenvolvimento da informática que atua fazendo a identificação do padrão celular tumoral, estes problemas foram minimizados (HEDLEY, FRIEDLANDER, e TAYLOR, 1983; HEDLEY, CLARK, CORNELLISE, KILLANDER, KUTE e MERKEL, 1993; CLARK, WENGER, BEARDSLEE, OWENS, POUNDS, OLDAKER, VENDLEY, PANDIAN, HARRINGTON, McGUIRE, 1993). Vários estudos foram realizados nos diferentes tipos tumorais, no intuito de se obter novos parâmetros para a identificação de grupos de pacientes que possuam pior prognóstico e que necessitam de terapêutica particularizada. Muitos destes, contaram com grandes amostragens e longo seguimento de pacientes, correlacionando outros fatores prognósticos com os dados obtidos pela citometria de fluxo, tais como os realizados por WENGER,

BEARDSLEE, OWENS, POUNDS, OLDAKER, VENDELY, PANDIAN, HARRINGTON (1993), aplicados aos tumores da mama e identificando sub-grupos de pacientes com pior prognóstico. Porém, estas comparações baseiam-se em apenas dois parâmetros obtidos pela análise citofotométrica de fluxo: a ploidia tumoral medida pelo índice de ADN e a fração de células em fase S. Contudo, apesar de décadas de esforços para o domínio da metodologia, na "Conferência de Consenso" sobre o uso da citometria, aplicada aos tumores de mama, realizada em 1993, conclui-se que é necessário a padronização das normas de interpretação dos resultados, entre os diferentes laboratórios (HEDLEY e colaboradores, 1993).

A citofotometria ou a análise da imagem do ADN, tem estudado esta metodologia, desde o domínio do processamento do material de estudo, até sua obtenção, coloração e análise nuclear, com o cálculo dos diferentes parâmetros, bem como, sua interpretação e correlação com outros parâmetros patológicos e clínicos. Os resultados obtidos estão descritos na literatura, com resultados significativos, no estudo dos tumores tireoidianos e neurológicos, realizados por SALMON (1993), nos tumores da bexiga, realizados por VAN VELTHOVEN, PETEIN, ZLOTTA, OOSTERLINCK, VAN DER MEIDJEN, ZANDONA, ROELS, PASTEELS, SCHULMAN e KISS (1994) e nos tumores de mama e gravidez por BUDEL (1994), entre outros. Esta metodologia apresentou grande avanço com o desenvolvimento dos recursos de informática apresentados na última década. Tal desenvolvimento não influencia apenas a precisão do cálculo dos parâmetros nucleares, mas é, também, decisiva na interpretação destes, através de cálculos estatísticos para a correlação nas diferentes amostragens em estudo. Além da vantagem da escolha visual do núcleo, exclusivamente tumoral e íntegro, a ser analisado pelo computador, esta metodologia é capaz de calcular 15 diferentes parâmetros de cada célula tumoral, de determinado tipo e grau de diferenciação histológica, podendo caracterizar um perfil cromatiniano para cada grupo tumoral que se deseja analisar e que o difere de outro grupo tumoral.

Por meio de um de seus parâmetros, pode-se determinar o perfil da ploidia de um tumor, pela identificação de seis diferentes histogramas com a determinação de

limites precisos da posição do pico G0-G1, bem como identificar as frações celulares em outras fases do ciclo celular. Pode-se, ainda, calcular a porcentagem de células euplóides e aneuplóides e a fração celular em fase S, fração proliferativa ou índice de proliferação. A ploidia, os parâmetros morfométricos, texturais e a proliferação celular podem determinar grupos tumorais, mais ou menos, agressivos quando associados a outros marcadores de comportamento tumoral, servindo como padrão prognóstico (KISS, 1987; de LAUNOIT, 1989).

Esta técnica encontra-se em fase de estabelecimento metodológico e reconhecimento científico no Brasil, em especial nas diversas linhas de pesquisa que estão sendo desenvolvidas no Instituto de Ensino e 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.

A citometria de imagem ou citofotometria merece ter a multiplicação de sua aplicação em outros ensaios envolvendo doenças gástricas e de outras topografias do aparelho digestivo, visando a validação técnica e clínica do método.

5.2 DO MATERIAL DE ESTUDO E DA AMOSTRA

O emprego da metodologia à amostragem, utilizada neste estudo, apresentou algumas dificuldades na obtenção de material apropriado para a análise dos blocos de parafina que continham os espécimes tumorais, no que se refere ao protocolo metodológico para análise citofotométrica. Seguindo-se a rotina do laboratório para o processo, ou seja, a desparafinização do material e a criação de uma suspensão, exclusivamente composta pelos núcleos e prontas para serem coradas pelo método de FEULGEN, obteve-se lâminas apropriadas, com eventual aparecimento de debris e com concentração nuclear satisfatória, para uma análise adequada dos casos. Porém, aqui reside a principal dificuldade para a realização do estudo. Houveram perdas do material dos blocos de parafina, devido principalmente e muito provavelmente, a não se seguir um protocolo criterioso e bem estabelecido

no processo de parafinização à época dos casos. Isto fez com que, após algumas tentativas de se aproveitar estes determinados blocos de parafina, os mesmos foram desprezados por não se conseguir um material de qualidade para a coloração de FEULGEN e análise citofométrica do caso. Dos 68 casos inicialmente selecionados para o estudo, uma vez que apresentavam no bloco parafinado uma quantidade de tecido tumoral considerável, 28 tiveram condições técnicas perfeitas para compor a amostragem deste trabalho, ou seja uma perda de 58,82%. Destes 28 casos, 16 eram originários da pequena curvatura e os 12 restantes pertenciam à grande curvatura gástrica. GUILGEN (1997) estudando casos de lesões cutâneas melanocíticas, também observou uma perda de 7 casos, dos 40 inicialmente propostos, porém esta se deu em virtude de que os blocos tinham sido previamente submetidos a uma microtomia para o diagnóstico histopatológico e, quando necessitou realizar a segunda microtomia de 80 micra para a análise citofotométrica, os 7 blocos não possuíam fragmentos histológicos com a lesão melanocítica em profundidade suficiente. Alerta que para o planejamento de futuras coletas de outras amostras, há necessidade de utilizar-se lesões o mais íntegras possíveis. 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 eram 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. Em discussão com estudiosos da análise citofotométrica de ADN, parece ser unânime entre estes 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.

5.3 CÂNCER GÁSTRICO

O carcinoma gástrico constitui-se num dos pontos mais intrigantes em oncologia. Uma vez entre os “os cânceres grandes matadores” dos Estados Unidos, está atualmente colocado no sexto lugar como causa de morte por câncer naquele país. Por razões não totalmente elucidadas, a incidência desta neoplasia caiu nas últimas décadas. Existem fortes sugestões de que influências ambientais estão na base deste “final feliz”, surgidas de uma multidão de outras especulações epidemiológicas.

Existe uma variação muito acentuada de país para país e dentro de um mesmo país, com relação à mortalidade por câncer gástrico. Países de alto risco como Japão, Chile, Costa Rica, Groenlândia e Finlândia tem incidência de mortalidade por tumor gástrico maligno cerca de 5 a 6 vezes maior que aquelas vistas em países de baixo risco (Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia).

A grande maioria dos epidemiologistas acredita que fatores ambientais estão na base do carcinoma gástrico. Os principais envolvidos incluem dieta, classe sócio-econômica baixa, habitação urbana, tipo de solo, ocupação. Embora os agentes etiológicos não estejam completamente elucidados, a evidência de que pólipos adenomatosos, pólipos vilosos, gastrite crônica atrófica ou atrofia gástrica e gastrite hipertrófica levam a uma disposição aumentada de carcinoma e, são referidas como lesões pré-malignas. A localização dos tumores gástricos malignos segue, via de regra, a seguinte distribuição: 39% na pequena curvatura; 12% na grande curvatura; nas paredes anterior e posterior em 24% e na circunferência em 25% dos casos.

A tendência para um câncer gástrico estar em estágio avançado no momento da sua detecção, levou a um considerável negativismo terapêutico. Isto não é totalmente justificado, visto que uma ressecção gástrica pode proporcionar um meio paliativo excelente na maioria dos pacientes ou uma cura ocasional quando o câncer está confinado ao epitélio gástrico.

As alternativas terapêuticas tais como cirurgias, quimioterapia, radioterapia e outras terapias adjuvantes tem tentado alijar a doença do paciente ou pelo menos aliviá-la, prolongando a sobrevida, em que pese muitas vezes com uma qualidade de vida bastante afetada.

O diagnóstico precoce e os estudos mais avançados correlacionando metástases e taxa de sobrevivência utilizando a citometria de imagem e a citometria de fluxo, tem sido objeto de estudo por alguns pesquisadores, em especial nos países orientais. Estudiosos como HARAGUCHI, KORENAGA, YONEMURA, entre outros, em especial na década de 90, tem buscado aprofundamento nesta linha de pesquisa objetivando, na linha final, um ganho na qualidade de vida dos pacientes portadores de câncer gástrico ou epidemiologicamente mais suscetíveis a serem acometidos desta doença.

5.4 DO DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

A utilização dos critérios para análise histopatológica encontram-se descritos no material e método e foram submetidos a análise de três patologistas de serviços conceituados em anatomia patológica da cidade de Curitiba/Paraná. A escolha de três patologistas deu-se em virtude de se buscar uma definição, a mais exata possível, dos grupos em estudo, para que nos casos de diferentes diagnósticos histológicos, seja quanto ao tipo, padrão, grau de diferenciação do tumor gástrico, houvesse uma terceira análise que delineasse o caso.

No presente estudo não houveram discordâncias no tipo histológico dos casos, sendo que os três patologistas consideraram as vinte e oito amostras como adenocarcinoma. O adenocarcinoma é considerado, de longe, o tumor maligno mais comum do estômago com 95%, ficando os 5% restantes para linfomas, leiomiossarcomas, angiossarcomas, carcinosarcoma, carcinoma de células pavimentosas e metástases de sítios primários adjacentes ou distantes (SCHWARTZ, SHIRES, SPENCER e STORER, 1987).

Já na avaliação do padrão histológico, se intestinal ou difuso, não houve unanimidade diagnóstica em 3 oportunidades (obs. 4, 9 e 28), ou 10,7% da amostra.

No estudo histológico do grau de diferenciação também pôde-se notar a discordância em 6 casos da amostragem (obs. 2, 12, 16, 23, 24 ,25), ou seja 21,4% da casuística.

Estes dados ajudam a reforçar a importância do apoio que a citofotometria pode dar no auxílio diagnóstico e prognóstico dos tumores gástricos malignos.

5.5 DO PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E DA ANÁLISE CITOFOTOMÉTRICA

Existem diversas possibilidades de causas para variação de resultados, quando se usa a citofotometria. Segundo COLLAN, TORKKELI, KOSMA, PESOSEN, KOSUNEN e JANTUNEN (1987), estas podem ser elencadas da seguinte forma: diferenças de pureza entre os campos analisados, diferenças biológicas entre os núcleos, variações causadas pelo cálculo dos parâmetros e as variações originadas durante o processamento do tecido a ser analisado. Assim, na realização destes tipos de estudos deve-se considerar que pode haver variação de resultados devidas ao pesquisador e ao laboratório onde se esteja realizando o ensaio científico.

5.5.1 Do preparo da lâmina para análise citofotométrica

Faz-se mister ressaltar, apesar de ser uma orientação básica porém que dificulta sobremaneira, a ponto de se perder muito tempo e inclusive poder inviabilizar uma pesquisa, que a qualidade de todos os reativos utilizados sejam de qualidade indiscutível. Durante a realização deste estudo, o processo de preparo da lâmina teve uma série de dificuldades em virtude de que a pronase a 0,05% (responsável pela digestão celular), que estava sendo utilizada no processo era de difícil obtenção, devido a que o transporte deveria ser feito em ambiente refrigerado para manter seu princípio reativo. Sanada esta dificuldade, em seguida houve perda substancial no primeiro lote de importação da pronase a 0,05% e sua principal causa foi queda de energia no período noturno, no ambiente onde estava armazenada. Após a solução destes fatores obstrutivos, obteve-se material de qualidade.

Para referendar a qualidade das lâminas, uma vez que é fundamental na avaliação dos resultados a presença de núcleos de excelente padrão, elas foram enviadas para Universidade Livre de Bruxelas, ao serviço do Professor Robert Kiss, que concedeu parecer favorável à qualidade do material. Faz-se mister ressaltar, porém, que para a obtenção de amostras de estudo sem grandes não-conformidades, o processo como um todo deve ser executado de maneira padronizada e adequada, incluindo desde a fixação do espécime em formalina e sua posterior parafinização até a obtenção dos núcleos.

5.5.2 Do procedimento de leitura

O processo de leitura das lâminas levou, em média, 60 minutos para aproximadamente 200 núcleos. A metodologia seguida neste estudo foi a descrita por BRUGAL & CHASSERY (1977), o qual consiste no rastreamento dos campos visuais segundo o princípio da barra grega. Cada lâmina foi avaliada pelo estudo de 20 até 40 linhas. A leitura dos casos necessita de um curto aprendizado, no sentido de se conhecer os comandos para a inicialização do programa do computador e a obtenção do foco necessário para uma imagem nítida de cada lâmina.

A qualidade dos núcleos analisados deve ser suprema, portanto os núcleos que se apresentavam fragmentados, sobrepostos, bem como os artefatos pigmentares, foram excluídos do procedimento de leitura.

O processamento dos dados requer, também, algumas informações sobre o funcionamento do programa do computador para a obtenção dos histogramas. Já para a interpretação dos histogramas e para o cálculo da fração de células em proliferação, o treinamento exige um pouco mais de tempo e atenção. Porém, após vários exemplos, chega-se a compreender e diagnosticar corretamente a grande maioria dos histogramas.

Os histogramas desta pesquisa também foram avaliados no serviço do Prof. Robert Kiss, da Universidade Livre de Bruxelas, sendo os resultados consonantes com os registrados no IPEM.

5.6 DOS PARÂMETROS ANALISADOS PELO SISTEMA SAMBA 4000

O sistema de análise de imagem computadorizada SAMBA 4000 foi desenvolvido para tentar minimizar este fator de interpretação, objetivando melhor quantificar e qualificar os fenômenos biológicos. O SAMBA foi desenvolvido na França, pela Alcatel, e teve no grupo de pesquisa do Prof. Dr. KISS, da Universidade Livre de Bruxelas, um dos pioneiros na utilização desta metodologia. A versão inicial foi a do SAMBA 200, cuja definição de imagem era sofrível e sem grande desenvolvimentos de software. A evolução foi para a versão SAMBA 2005, que apresentava uma melhor definição de imagens, apesar de câmera e software preto e branco. A versão seguinte foi o SAMBA 2005 em cores, que aumentou o campo de ampliação, principalmente com vistas à quantificação histoquímica. A versão mais atualizada, e existente no Brasil, denomina-se SAMBA 4000 e foi 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 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.

5.6.1 Variável morfométrica

Esta variável representa a área nuclear, correlacionando-se diretamente com o número de pontos de imagem que representam um núcleo.

No presente estudo, o cálculo da área nuclear (# 1) apresentou nos graus considerados “bem diferenciado” resultado significativamente maior em comparação aos “moderadamente diferenciados”, conforme nota-se no gráfico 1.

O auxílio do valor da área nuclear foi ressaltado por BUDEL (1994) quando da determinação de escore de graduação no carcinoma ductal de mama, analisando a

capacidade correlação prognóstica. GASPERIN JR. (1994) em sua pesquisa demonstrou que o parâmetro 1 (área nuclear) é capaz de auxiliar na graduação tumoral clássica de tumores mamários ductais e conclui que quanto maior for a área nuclear, maior será o grau de diferenciação tumoral, sendo então o tumor mais indiferenciado. Esta correlação não pode ser transportada para este estudo, aonde se avalia patologia tumoral gástrica, pois o que se nota é exatamente o oposto. Nos casos considerados bem diferenciado, a área nuclear foi significativamente maior.

5.6.2 Variáveis densitométricas

São calculadas tendo como base a 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. Neste conjunto pode-se encontrar os parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular (# 2) e os parâmetros extraídos do histograma dos valores das densidades ópticas (# 4, # 5 e # 6). Discutir-se-ão os parâmetros que apresentaram os resultados estatísticos significativos. Portanto, os parâmetros # 2, # 4 e # 5 não serão discutidos.

O parâmetro # 6 (Índice de Curtose) é um informativo da heterogeneidade densitométrica nuclear, que auxilia no aplainamento do histograma, medindo a altura e largura do pico maior do histograma. O seu valor amplia-se quando da grandeza do pico histograma e da pequenez da base, o que significa o aumento da homogeneidade nos graus de condensação da cromatina. Portanto, quanto menores seus valores, mais os valores da densidade óptica do núcleo são variáveis e mais o núcleo é heterogêneo. Quando confrontados os graus de diferenciação moderadamente X bem e moderadamente X pouco diferenciado, obteve-se resultado estatisticamente significativo em ambos os cruzamentos, conforme pode ser avaliado nos gráficos 2 e 3, respectivamente. O índice de Curtose (# 6) foi significativamente maior no casos “bem diferenciados” em relação aos “moderadamente diferenciados”, ou seja, aqueles apresentaram uma menor variação da densidade óptica do núcleo e um núcleo mais homogêneo. Quando da comparação dos casos “pouco diferenciados” e “moderadamente diferenciados”, o

índice de Curtose (# 6) foi significativamente maior nestes, o que implica possuírem uma variação da densidade óptica e um núcleo mais heterogêneo em relação aos casos “pouco diferenciados”. Na revisão de literatura não detectamos resultados semelhantes que pudessem ser confrontados com os deste estudo.

5.6.3 Variáveis texturais

Referem-se aos atributos da textura e objetivam caracterizar a organização das manchas densas dentro do núcleo. Os parâmetros obtidos das matrizes de comprimento das secções (# 7, # 8, # 9, # 10, # 11) e os obtidos da matriz de co-ocorrência (# 12, # 13, # 14 e # 15) não apresentaram resultados estatisticamente significativos e, portanto, não serão discutidos neste estudo.

5.6.4 Histograma do ADN

É a representação gráfica em forma de área da distribuição dos núcleos segundo a fase do ciclo celular a que eles pertencem. A abscissa do histograma demonstra a condensação: ou seja quanto mais o pico médio se direciona a valores altos, mais condensada está a cromatina (graus de cinza) e quanto mais estreita a base do pico, mais homogênea a distribuição dos graus de condensação da cromatina. A ordenada do histograma demonstra a distribuição (porcentagem de células por classe).

O histograma foi classificado de acordo com o valor da ploidia do pico G0-G1 da população celular que o compõe. Nos casos de população celular pura, quanto ao conteúdo de ADN nuclear, classificam-se os histogramas em diplóides, hiperdiplóides ($2n/3n$), triplóides, hipertriplóides ($3n/4n$), e tetraplóides. Quando existem vários picos de G0-G1, a classificação é do tipo polimorfo (poliplóide ou aneuplóide).

No presente estudo, dos 17 casos considerados padrão histológico intestinal, 11 (64,7%) foram classificados como diplóides e 2 (11,7%) aneuplóides. Dos 11

casos com padrão histológico difuso, também a maioria, ou seja 7 (63,6%) foram classificados diplóides e 1 (14,3%) foi considerado aneuplóide. MELLIN, HEIDL, KELLER, REERS e SASSE (1994), estudaram o valor prognóstico da ploidia do DNA e em peças ressecadas de carcinoma esofágico e gástrico. Notaram que a ploidia do ADN e os resultados clínicos foram menos fortes nos carcinomas de padrão intestinal da cárdia do que naqueles oriundos do estômago, concluindo que o motivo para isto seria que as metástases linfonodais do carcinoma da cárdia são bastante influenciados pelas condições locais da drenagem linfática e tensões mecânicas.

Em relação aos graus de diferenciação, os 3 casos considerados “bem diferenciado” foram classificados como diplóides, isto significa 100 % desta amostra. Sete dos 11 casos “moderadamente diferenciado” foram também diplóides (63,6%) e 1 classificado com aneuplóide (9,1%). Oito dos 14 casos “pouco diferenciado” foram considerados diplóides (57,1%), com 2 dos 14 casos da amostragem (14,3%), sendo classificados como aneuplóides. Portanto pode-se notar uma curva de tendência crescente, quando correlaciona-se grau de diferenciação menor (pouco diferenciado) e aneuploidia, bem como maior grau de diferenciação (bem diferenciado) e diploidia.

Estes resultados encontram subsídio na literatura nos estudos de câncer gástrico realizados por SUH & MIN (1993), CARLINI, GAROFALO, RINALDI, D'AGNANO, D'ANGELO, ZUPI, VECCHIONE e SANTORO (1994), MIZUNUMA, TSUCHIYA, ANDO, KIKUCHI e ABE (1996), KIM LEE, KIM YK, BAIK, LEE, KWON e JUNG (1997), aonde estes autores detectaram que quanto menor a diferenciação histológica maior a probabilidade de que os casos apresentem um histograma do tipo aneuplóide ou polimorfo e quanto maior for sua diferenciação existe maior tendência de classificação diplóide para estes tumores.

Na literatura relativa à pesquisa em tumores ovarianos (FRIEDLANDER, HEDELEY, RUSSEL, COATES e TATTERSALL, 1984; VOLM, BRUGGEMANN, GÜNTHER, KLEINE, PFLEIDERER e VOGT-SCHADEN, 1985; IVERSEN & SKARLAND, 1987; RODEMBURG, PLOEM-ZAAIJER, CORNELISSE, MESKER, HERMANS, HEINTZ, PLOEM e FLEUREN, 1987; KALLIOMENI, PUNNONEN, MATILA, LEHTINEN e KOIVULA, 1988; KLEMI, JOENSUU, KILHOLMA e MÄENPÄÄ, 1988; HAAPASALO, ATKIN, COLLAN, PESOSEN e PALJÄRVI, 1991; BELL, 1991; CHIECO, MELCHIORRI, LISIGNOLI, MARABINI e ORLANDI, 1991;

KHOO, BATTISTUTTA, HURST, SANDERSON, WARD e FREE, 1993) há o consenso a respeito do valor prognóstico dos parâmetros obtidos pela análise do conteúdo de ADN nuclear, sobretudo quanto ao perfil diplóide e aneuplóide; às porcentagens de células com conteúdo euplóide e aneuplóide; e à atividade proliferativa, quando comparados aos parâmetros prognósticos: estadió clínico, grau de diferenciação histológica e doença residual. Os resultados obtidos por estes autores, demonstram que tumores com taxa de ADN aneuplóide, maior porcentagem de células com conteúdo aneuplóide e maior atividade proliferativa, apresentam pior prognóstico quanto à probabilidade de recidivas e sobrevida global.

Vários estudiosos reiteram a importância da citometria de imagem nos dados prognósticos dos pacientes portadores de câncer gástrico, porém TSUCHIYA & HOSHINO (1990) alertam que a redução dos níveis de ploidia de ADN nuclear nos tipos invasivos de tumor não significa boa evolução clínica na sua totalidade, pois eles identificaram casos em que o valor da ploidia era significativamente reduzida, porém as células do tumor invadiam a superfície peritoneal.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

6.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

- Não houveram diferenças estatisticamente significativas quando comparados os padrões histológicos “intestinal e difuso”.
- A área nuclear (# 1) dos tumores considerados bem diferenciados foi estatisticamente maior do que os moderadamente diferenciados.

6.2 PARÂMETROS DENSITOMÉTRICOS

- Não houveram diferenças significativas, sob o ponto de vista estatístico, na comparação entre os graus de diferenciação “bem, moderadamente e pouco diferenciados” e os padrões histológicos “intestinal e difuso”.

6.3 PARÂMETROS TEXTURAIS DA CROMATINA

- Não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os padrões histológicos “intestinal e difuso”.
- O índice de Curtose (# 6) foi significativamente maior nos casos “bem diferenciado” em relação aos casos “moderadamente diferenciado”.
- O índice de Curtose (# 6) obteve resultado estatisticamente maior nos casos “pouco diferenciado” em relação aos “moderadamente diferenciado”.

6.4 PARÂMETROS DE PLOIDIA (TIPAGEM DO HISTOGRAMA)

- 64,7% dos tumores com padrão histológico intestinal foram considerados diplóides e 11,7% classificados como aneuplóides.
- Em relação ao padrão histológico difuso, 63,6% dos casos foram classificados como diplóide e 14,3% como aneuplóide.
- Os casos “bem diferenciados” foram 100% classificados com diplóides.
- Nos casos “moderadamente diferenciados”, 63,6% foram diplóides e 9,1% aneuplóides.
- Os casos “pouco diferenciados” obtiveram um histograma do tipo diplóide em 57,1% e 14,3% do tipo aneuplóide.

ANEXOS – RESULTADOS DA CITOFOTOMETRIA

RE981043 – GC

Quick statistics

Total number of objects : 185; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	8325.26	2752.88	7928.57	8721.96
2	2567.85	1314.39	2378.44	2757.25
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.95676	2.89609	2.53942	3.37409
5	4.50811	1.94553	4.22775	4.78846
6	511.859	1074.87	356.968	666.751
7	39.0108	4.02558	38.4307	39.5909
8	24.5784	8.39534	23.3686	25.7882
9	17.4865	3.04756	17.0473	17.9256
10	23.4108	6.00215	22.5459	24.2757
11	56.4811	8.91768	55.1960	57.7661
12	134.043	48.9505	126.989	141.097
13	12.4000	5.45270	11.6143	13.1857
14	256.341	46.6367	249.620	263.061
15	348.724	194.286	320.727	376.721

RE96069 - CG

Quick statistics

Total number of objects : 200; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7752.95	1373.56	7562.58	7943.32
2	2145.06	637.667	2056.69	2233.44
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.89000	2.83864	3.49658	4.28342
5	4.34000	1.45753	4.13800	4.54200
6	646.515	1035.79	502.962	790.068
7	41.4450	3.73323	40.9276	41.9624
8	19.3950	6.28959	18.5233	20.2667
9	19.3800	2.90269	18.9777	19.7823
10	23.9300	5.19472	23.2100	24.6500
11	62.3150	8.64269	61.1172	63.5128
12	123.730	42.9940	117.771	129.689
13	11.9450	5.22704	11.2206	12.6694
14	262.005	41.9955	256.185	267.825
15	416.815	176.618	392.337	441.293

RE98226 - GC

Quick statistics

Total number of objects : 200; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7889.25	1493.31	7682.29	8096.22
2	2821.09	806.392	2709.33	2932.86
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.27500	1.70862	3.03820	3.51180
5	5.97500	1.71008	5.73799	6.21201
6	496.040	361.864	445.888	546.192
7	44.0300	5.30087	43.2953	44.7647
8	15.4650	5.77830	14.6642	16.2658
9	21.5850	4.00535	21.0299	22.1401
10	18.5850	4.55113	17.9542	19.2158
11	68.8700	10.3064	67.4416	70.2984
12	178.405	49.9483	171.483	185.327
13	7.76000	4.64461	7.11629	8.40371
14	307.400	45.1469	301.143	313.657
15	604.885	254.569	569.604	640.167

RE974857 - GC

Quick statistics

Total number of objects : 224; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7483.17	1614.99	7271.67	7694.67
2	2088.70	686.136	1998.85	2178.56
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	1.10268	1.07454	.961959	1.24340
5	5.28571	2.13779	5.00575	5.56568
6	376.504	119.706	360.828	392.181
7	40.8304	5.17099	40.1532	41.5075
8	19.1473	7.67246	18.1426	20.1521
9	19.2857	4.05085	18.7552	19.8162
10	21.5223	5.20040	20.8413	22.2034
11	62.8527	10.6075	61.4635	64.2418
12	178.076	62.3999	169.904	186.248
13	9.37946	4.57709	8.78006	9.97887
14	279.362	46.2106	273.310	285.413
15	451.518	268.190	416.396	486.639

R

E96328 - CG

Quick statistics

Total number of objects : 201; 15 parameters

Parameter Mean Std. Dev. 5 % Confidence interval

1	13216.4	3670.78	12708.9	13723.8
2	3217.78	1283.65	3040.32	3395.24
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.78109	3.13095	3.34825	4.21394
5	4.18905	1.43311	3.99093	4.38718
6	827.965	1490.11	621.961	1033.97
7	40.9552	3.22352	40.5096	41.4009
8	23.0100	7.70151	21.9452	24.0747
9	18.6368	2.48827	18.2928	18.9808
10	24.0249	4.68876	23.3767	24.6731
11	58.6318	7.65187	57.5740	59.6897
12	121.030	38.2227	115.746	126.314
13	13.5274	5.35975	12.7864	14.2683
14	252.348	39.4038	246.901	257.796
15	389.776	185.588	364.119	415.433

RE953585 - GC

Quick statistics

Total number of objects : 215; 15 parameters

Parameter Mean Std. Dev. 5 % Confidence interval

1	8302.97	1900.26	8048.96	8556.98
2	1868.87	350.954	1821.96	1915.79
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.31163	3.06982	1.90128	2.72197
5	5.63721	2.02508	5.36652	5.90790
6	840.019	2737.28	474.124	1205.91
7	40.1488	4.59586	39.5345	40.7632
8	22.0930	9.70786	20.7954	23.3907
9	18.5767	3.51375	18.1071	19.0464
10	19.7907	5.38973	19.0702	20.5111
11	59.8977	10.4916	58.4953	61.3001
12	163.879	50.6881	157.104	170.655
13	9.73488	5.32824	9.02265	10.4471
14	284.056	49.0173	277.504	290.608
15	460.674	220.087	431.255	490.094

RE964853 - CG

Quick statistics

Total number of objects : 201; 15 parameters

Parameter Mean Std. Dev. 5 % Confidence interval

1	8799.27	1365.05	8610.56	8987.99
2	2066.71	349.682	2018.37	2115.05
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.90547	1.70046	2.67039	3.14056
5	4.77612	1.23168	4.60584	4.94640
6	657.652	369.098	606.625	708.679
7	41.5522	3.07591	41.1270	41.9775
8	22.9254	9.10903	21.6661	24.1847
9	18.9602	2.29392	18.6431	19.2773
10	22.2537	4.30553	21.6585	22.8490
11	59.2040	8.01884	58.0954	60.3126
12	150.403	31.3428	146.070	154.736
13	12.2139	5.40030	11.4674	12.9605
14	262.254	37.2002	257.111	267.397
15	418.408	149.156	397.788	439.028

RE972758 - GC

Quick statistics

Total number of objects : 204; 15 parameters

Parameter Mean Std. Dev. 5 % Confidence interval

1	8435.85	1720.51	8199.75	8671.95
2	2079.29	366.378	2029.01	2129.57
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	1.98039	.901854	1.85663	2.10415
5	6.41667	1.91944	6.15327	6.68007
6	493.113	155.425	471.784	514.441
7	46.9853	6.53533	46.0885	47.8821
8	13.3873	5.75326	12.5977	14.1768
9	23.7990	5.11570	23.0970	24.5010
10	17.9657	4.41741	17.3595	18.5719
11	74.2108	12.3065	72.5220	75.8996
12	190.191	54.5642	182.703	197.679
13	6.87255	3.66401	6.36975	7.37535
14	318.740	45.3917	312.511	324.969
15	759.471	351.875	711.184	807.757

RE953485 - CG

Quick statistics

Total number of objects : 200; 15 parameters

Parameter Mean Std. Dev. 5 % Confidence interval

1	10323.6	2315.24	10002.7	10644.5
2	2164.53	684.974	2069.60	2259.46
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	4.62500	1.75624	4.38160	4.86840
5	5.04500	1.71259	4.80765	5.28235
6	855.635	406.003	799.366	911.904
7	43.7950	4.64684	43.1510	44.4390
8	17.3850	5.17366	16.6680	18.1020
9	20.8950	3.50342	20.4095	21.3806
10	21.9300	5.22830	21.2054	22.6546
11	65.5950	8.68049	64.3919	66.7981
12	119.995	39.8825	114.468	125.522
13	10.7200	3.94989	10.1726	11.2674
14	278.860	42.2112	273.010	284.710
15	560.750	264.609	524.077	597.423

RE962440 - GC

Quick statistics

Total number of objects : 220; 15 parameters

Parameter Mean Std. Dev. 5 % Confidence interval

1	9804.55	2451.60	9480.59	10128.5
2	1967.66	554.898	1894.34	2040.99
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	1.59091	1.21577	1.43025	1.75156
5	4.56818	1.66512	4.34815	4.78822
6	459.355	238.283	427.867	490.842
7	39.9500	3.43143	39.4966	40.4034
8	23.9136	9.12871	22.7073	25.1199
9	18.0545	2.73640	17.6929	18.4161
10	23.4136	5.46366	22.6917	24.1356
11	57.7136	8.80367	56.5503	58.8770
12	143.432	43.8884	137.632	149.231
13	12.6455	6.06643	11.8438	13.4471
14	255.818	44.8802	249.888	261.749
15	362.118	167.656	339.964	384.273

RE974984 - GC

Quick statistics

Total number of objects : 200; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval
1	7441.88	1486.33	7235.89 7647.88
2	3164.93	952.427	3032.93 3296.93
3	.000000	.000000	.000000 .000000
4	1.37500	1.13771	1.21732 1.53268
5	8.84000	3.45751	8.36081 9.31919
6	375.635	150.378	354.794 396.476
7	50.4950	8.56505	49.3079 51.6821
8	11.2300	6.51284	10.3274 12.1326
9	27.0300	7.09430	26.0468 28.0132
10	14.5250	5.87787	13.7104 15.3396
11	82.0400	16.5783	79.7424 84.3376
12	275.245	102.736	261.007 289.483
13	4.65000	4.32637	4.05040 5.24960
14	359.000	65.6488	349.902 368.098
15	947.640	511.035	876.814 1018.47

RE974833 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 210; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval
1	8588.23	2520.61	8247.31 8929.15
2	3261.90	1278.57	3088.97 3434.8
3	.952381E-02	.971242E-01	-.361251E-02 .226601E-01
4	2.35714	1.81031	2.11229 2.60199
5	6.76190	2.76724	6.38763 7.13618
6	420.062	335.265	374.716 465.407
7	45.9619	7.85392	44.8996 47.0242
8	14.8952	7.56360	13.8722 15.9182
9	23.2381	6.34489	22.3799 24.0963
10	17.5857	5.66146	16.8200 18.3514
11	72.4143	15.1866	70.3603 74.4683
12	199.043	85.4623	187.484 210.602
13	6.79048	4.67046	6.15878 7.42217
14	320.148	58.6394	312.216 328.079
15	702.052	440.721	642.444 761.661

RE942868 - GC

Quick statistics

Total number of objects : 207; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval
1	10139.4	1974.52	9870.42 10408.4
2	2122.46	747.514	2020.63 2224.30
3	.000000	.000000	.000000 .000000
4	3.17874	1.40459	2.98740 3.37009
5	4.05314	1.30109	3.87589 4.23039
6	601.643	268.296	565.093 638.192
7	41.2512	4.24658	40.6727 41.8297
8	18.2126	5.84859	17.4158 19.0093
9	19.4396	3.22205	19.0007 19.8786
10	24.9275	5.38647	24.1937 25.6613
11	63.4734	9.05100	62.2404 64.7064
12	110.435	33.5146	105.869 115.000
13	11.9227	4.59193	11.2971 12.5483
14	259.464	40.2877	253.975 264.952
15	439.386	196.554	412.610 466.163

RE972432 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 200; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval
1	10348.7	2566.29	9993.02 10704.4
2	2734.80	1025.92	2592.61 2876.99
3	.000000	.000000	.000000 .000000
4	2.82500	1.70715	2.58840 3.06160
5	6.16000	1.93246	5.89217 6.42782
6	671.905	733.776	570.209 773.601
7	45.9400	6.08166	45.0971 46.7829
8	15.0250	6.50726	14.1231 15.9269
9	22.8250	4.63296	22.1829 23.4671
10	18.6600	4.62973	18.0184 19.3016
11	71.1500	11.7634	69.5197 72.7803
12	178.560	47.4521	171.983 185.137
13	7.95500	4.52029	7.32852 8.58148
14	308.955	48.7905	302.193 315.717
15	713.090	332.539	667.002 759.178

R

RE953612 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 201; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval
1	9653.14	2842.53	9260.17 10046.1
2	4520.55	2863.00	4124.75 4916.36
3	.248756E-01	.155746	.334409E-02 .464072E-01
4	2.12438	2.14626	1.82766 2.42109
5	7.90547	3.83828	7.37484 8.43611
6	414.706	530.270	341.398 488.015
7	45.0697	7.60041	44.0189 46.1204
8	15.5423	7.65028	14.4847 16.5999
9	22.5821	6.06880	21.7431 23.4211
10	15.7711	6.75347	14.8375 16.7048
11	70.8209	14.9346	68.7562 72.8856
12	230.851	110.277	215.605 246.096
13	6.33333	5.02465	5.63869 7.02798
14	331.224	66.8370	321.984 340.464
15	669.677	417.075	612.017 727.336

E951809 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 200; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval
1	10249.3	2007.49	9971.05 10527.5
2	2055.19	385.623	2001.74 2108.63
3	.000000	.000000	.000000 .000000
4	3.60000	1.34907	3.41303 3.78697
5	4.06000	1.21918	3.89103 4.22897
6	685.875	255.336	650.487 721.263
7	40.9250	3.57343	40.4297 41.4202
8	22.7200	7.63031	21.6625 23.7775
9	18.7900	2.66005	18.4213 19.1587
10	24.8400	4.38798	24.2319 25.4481
11	59.3200	8.29323	58.1706 60.4694
12	119.230	29.0322	115.206 123.254
13	15.1150	5.96589	14.2882 15.9418
14	248.425	38.2991	243.117 253.733
15	408.530	167.111	385.370 431.690

RE963318 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 210; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	11866.0	3973.47	11328.6	12403.5
2	2741.45	1192.55	2580.16	2902.75
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.10000	1.44897	2.90402	3.29598
5	4.37619	1.47564	4.17661	4.57578
6	620.795	335.824	575.374	666.216
7	41.1857	4.24363	40.6118	41.7597
8	20.9095	7.85684	19.8469	21.9722
9	19.1000	3.20334	18.6667	19.5333
10	23.5952	5.26832	22.8827	24.3078
11	61.2571	9.32232	59.9963	62.5180
12	125.943	33.7176	121.382	130.503
13	12.5571	5.85288	11.7655	13.3488
14	261.976	44.8956	255.904	268.048
15	454.852	199.198	427.910	481.794

RE961133 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 242; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	8172.66	1627.59	7967.59	8377.72
2	2143.38	455.863	2085.94	2200.81
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.02479	1.68838	1.81207	2.23752
5	5.85124	1.91627	5.60980	6.09268
6	539.306	523.122	473.396	605.216
7	41.9339	4.62966	41.3506	42.5172
8	19.9669	8.37246	18.9121	21.0218
9	19.7645	3.72038	19.2957	20.2332
10	19.5579	4.86074	18.9454	20.1703
11	62.7727	10.3106	61.4737	64.0718
12	179.116	54.6119	172.235	185.996
13	9.45455	4.74995	8.85608	10.0530
14	286.996	45.9512	281.206	292.785
15	480.930	233.838	451.468	510.392

RE974445 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 202; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	9492.40	1704.18	9257.38	9727.41
2	1990.15	260.023	1954.29	2026.01
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.92574	1.16442	2.76516	3.08632
5	4.84158	1.09664	4.69035	4.99282
6	642.228	268.755	605.165	679.290
7	43.0099	3.78899	42.4874	43.5324
8	16.7327	5.23108	16.0113	17.4541
9	20.5792	2.85563	20.1854	20.9730
10	21.7475	3.54052	21.2593	22.2358
11	66.1089	8.08362	64.9941	67.2237
12	141.614	27.1643	137.868	145.360
13	10.1535	4.30648	9.55958	10.7474
14	280.178	33.6812	275.533	284.823
15	529.421	180.237	504.565	554.276

RE951346 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 192; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7582.42	1705.82	7341.13	7823.71
2	2340.84	897.807	2213.84	2467.83
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.17188	1.44216	1.96788	2.37587
5	5.86458	2.36784	5.52965	6.19952
6	459.219	208.964	429.661	488.777
7	42.5990	6.56940	41.6697	43.5282
8	18.5260	8.59865	17.3098	19.7423
9	20.5938	5.22828	19.8542	21.3333
10	19.8281	5.76327	19.0129	20.6433
11	65.5521	13.6682	63.6187	67.4855
12	187.844	75.3716	177.182	198.505
13	9.02083	5.38706	8.25883	9.78284
14	293.943	56.2246	285.990	301.896
15	541.693	310.609	497.757	585.629

RE974100 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 206; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	10519.8	2808.06	10136.4	10903.3
2	2336.90	986.293	2202.21	2471.59
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.75728	1.45125	2.55910	2.95546
5	4.10680	1.48724	3.90370	4.30989
6	575.922	314.556	532.967	618.878
7	40.2476	3.76001	39.7341	40.7610
8	22.0631	7.20106	21.0797	23.0465
9	18.4806	2.85696	18.0904	18.8707
10	24.5631	4.80427	23.9070	25.2192
11	59.4854	8.54101	58.3191	60.6518
12	121.534	38.1039	116.331	126.737
13	13.4757	5.17433	12.7691	14.1823
14	251.786	40.9754	246.191	257.382
15	404.131	175.460	380.170	428.092

RE93393 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 206; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7764.34	1316.04	7584.62	7944.06
2	2106.86	381.691	2054.74	2158.98
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.51942	1.56637	3.30552	3.73332
5	4.27184	1.00672	4.13437	4.40932
6	529.981	203.428	502.201	557.761
7	38.8981	3.92455	38.3621	39.4340
8	24.0243	7.61478	22.9844	25.0641
9	17.6019	2.88733	17.2076	17.9962
10	23.4320	3.70682	22.9258	23.9382
11	57.0000	8.29142	55.8677	58.1323
12	129.184	25.8167	125.659	132.710
13	12.9175	4.59189	12.2904	13.5445
14	255.481	32.9029	250.987	259.974
15	383.039	148.969	362.696	403.382

RE951889 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 225; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7996.13	1657.57	7779.54	8212.72
2	1900.09	376.365	1850.91	1949.27
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.29778	1.25618	3.13364	3.46192
5	5.76889	1.76884	5.53776	6.00002
6	687.369	292.721	649.120	725.618
7	45.8044	5.35139	45.1052	46.5037
8	14.7333	5.26033	14.0460	15.4207
9	22.6667	4.18675	22.1196	23.2137
10	19.3822	4.36202	18.8123	19.9522
11	70.8267	10.4329	69.4634	72.1899
12	155.876	48.5531	149.531	162.220
13	8.40889	4.04990	7.87970	8.93808
14	302.898	43.4102	297.225	308.570
15	687.640	308.566	647.321	727.959

RE974670 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 200; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	9697.29	1814.49	9445.82	9948.77
2	2172.85	554.830	2095.95	2249.75
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	2.64000	1.88955	2.37812	2.90188
5	3.48500	1.14881	3.32578	3.64422
6	533.190	331.001	487.316	579.064
7	38.0350	3.29450	37.5784	38.4916
8	25.2850	7.12276	24.2978	26.2722
9	16.9050	2.34007	16.5807	17.2293
10	26.8150	4.84569	26.1434	27.4866
11	55.2100	7.43007	54.1802	56.2398
12	108.985	30.6017	104.744	113.226
13	15.0000	5.28772	14.2672	15.7328
14	235.365	37.4797	230.171	240.559
15	333.285	145.234	313.157	353.413

RE973362 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 200; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	7803.65	1894.62	7541.06	8066.23
2	2417.89	876.981	2296.35	2539.43
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	3.35000	1.94358	3.08063	3.61937
5	5.86000	2.28482	5.54334	6.17666
6	604.220	781.987	495.842	712.598
7	43.5000	6.06960	42.6588	44.3412
8	17.7400	8.02511	16.6278	18.8522
9	21.1200	4.68247	20.4710	21.7690
10	19.5800	5.53115	18.8134	20.3466
11	66.6800	12.3372	64.9701	68.3899
12	170.555	61.8873	161.978	179.132
13	9.31500	5.76158	8.51649	10.1135
14	295.620	54.6886	288.041	303.199
15	597.530	312.498	554.220	640.840

RE952966 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 204; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	8008.37	1550.80	7795.55	8221.18
2	2295.10	586.405	2214.63	2375.57
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	5.38725	2.27347	5.07527	5.69924
5	6.38725	2.23870	6.08004	6.69447
6	941.113	542.475	866.670	1015.56
7	48.0049	5.88575	47.1972	48.8126
8	16.2255	6.86267	15.2837	17.1672
9	23.8578	4.70339	23.2124	24.5033
10	18.5588	5.12123	17.8561	19.2616
11	70.5343	11.8153	68.9129	72.1557
12	159.172	51.7365	152.072	166.271
13	9.71078	5.55010	8.94916	10.4724
14	302.613	51.3525	295.566	309.660
15	818.093	394.781	763.918	872.268

RE974281 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 210; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	8507.17	2277.14	8199.18	8815.16
2	2589.00	740.402	2488.86	2689.14
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	1.64286	1.18365	1.48277	1.80295
5	5.83333	2.25427	5.52844	6.13823
6	402.957	144.272	383.444	422.470
7	42.9476	5.95955	42.1416	43.7537
8	18.2571	9.05068	17.0330	19.4813
9	20.7476	4.69327	20.1128	21.3824
10	20.0571	6.07310	19.2357	20.8785
11	65.9190	12.6746	64.2048	67.6333
12	188.786	62.1522	180.379	197.192
13	8.92857	5.57372	8.17471	9.68243
14	291.995	55.0904	284.544	299.446
15	523.776	295.836	483.764	563.789

RE963414 - PC

Quick statistics

Total number of objects : 251; 15 parameters

Parameter	Mean	Std. Dev.	5 % Confidence interval	
1	9391.79	2465.45	9086.78	9696.80
2	4336.73	1754.20	4119.71	4553.75
3	.000000	.000000	.000000	.000000
4	1.78486	1.26614	1.62822	1.94150
5	7.65737	2.61511	7.33385	7.98090
6	354.880	124.296	339.503	370.258
7	46.3745	8.15704	45.3654	47.3836
8	13.1235	5.86541	12.3979	13.8491
9	23.9323	6.31947	23.1505	24.7141
10	15.1235	4.38359	14.5812	15.6658
11	74.9084	14.4841	73.1165	76.7002
12	234.474	77.6029	224.874	244.075
13	4.92032	3.17385	4.52767	5.31297
14	342.526	52.6504	336.012	349.040
15	783.219	430.280	729.987	836.451

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.; 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.
3. 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.
4. BELL, D.A. Ovarian surface epithelial-stromal tumors. **Human Pathology**, Philadelphia,v.22, p. 750-762, 1991.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. BRUGAL, G.; GARBAY, C.; GIROUD, G.; ADHEL. D. A double scanning microphotometric for image analysis: hardware, software and biomedical applications. **J Histochem Cytochem**, v. 27, p. 144-152, 1979.

9. 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.
10. 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.
11. CASPERSON, T. Über den Chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. *Skand Arch Physiol*, v.73, suppl.8, p.1-151, 1936.
12. CASPERSON, T. A universal ultramicrospectograph for the optical range. *Exp Cell Res*, v.1, p.595-612, 1950.
13. CHIECO, P.; MELCHIORRI, C.; LISIGNOLI, G.; MARABINI, A.; ORLANDI, C. A multifaced DNA ploidy analysis to determine ovarian carcinoma aggressiveness. *Cancer*, Philadelphia, v.67, p.1878-1885, 1991.
14. CLARK, G.M.; WENGER, C.R.; BEARDSLEE, S.; OWENS, M.A.; POUNDS, G.; OLDAKER, B.A.; VENDLEY, P.; PANDIAN, M.R.; HARRINGTON, D.; MCGUIRE, W.L., How to integrate steroid hormone receptor, flow cytometric, and other prognostic information in regard to primary breast cancer. *Cancer*, Philadelphia, v.71, p.2157-62, 1993.
15. COELHO, J. C. U. **Aparelho digestivo – Clínica e Cirurgia**. 1ª ed., Medsi – Editora médica e científica, Rio de Janeiro, p.307-24, 1990.
16. COHEN, C.; WALKER, B.F.; SOLOMON, A.R.; DeROSE, P.B. DNA ploidy and cell cycle analysis in ear malignant melanoma by flow and image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol*, v.14, n.2, p.81-88, 1992.
17. 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.
18. COLOMB, E.; KOPP, F.; SPYRATOS, F.; MARTIN, P.M. Cell-cycle studies by multiparametric automatic scanning of topographically preserved cells culture. *Cytometry*, New York, v.10, p.263-272, 1989.
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 tipping 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 em 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. 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.
25. 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.
26. 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.
27. ETIEVAN, C.; KRUCZYNSKI, A.; PAUWELS, O.; KISS, R. The influence of the tetrazolium derivative reduction and digital cell image analysis to monitor in vitro cytotoxicity of anti-neoplastic drugs. **Anticancer Research**, v.11, p.305-312, 1991.
28. FEULGEN, R.; ROSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende Elektive Färbung von Seelherne in mikroskopischen Preparaten. **Z Physiol Chem**, Leipzing, v.135, p.203-248, 1924.

29. 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.
30. FRIEDLANDER, M.L.; HEDLEY, D.W.; TAYLOR, I.W.; RUSSEL, P.; COATES, A.S.; TATTERSALL, M.H.N. Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v.44, p.397-400, 1984.
31. GALLOWAY, M.M. Texture analysis using gray run length. **Computer graphics image processing**, v.4, p.172-179, 1975.
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**, larrytown, v.22, 9, p.979-87, 1992.
36. GIROUD, F. Thèse de Doctorat en Sciences, intitulée: "Approches cytometric 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. HAAPASALO, H.; ATKIN, N.B.; COLLAN, Y.; PESONSEN, E.; PALJÄRVI, L. Tumor ploidy, morphometry, histological grading, and clinical features in ovarian carcinoma: mutual relations. **Analytical Cellular Pathology**, v.3, p.261-271, 1991.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. HARALICK, R.M.; SHANMUGAN, T.; DINSTEN, I. Textural features for image classification. **IEE Trans Syst Man Cyber SMC**, v.3, p.610-621, 1973.
44. 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.
45. 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.4, p.482-85, 1993.
46. IVERSEN, O. & SKAARLAND, E. Ploidy assessment of benign and malignant ovarian tumors by flow cytometry. **Cancer**, Philadelphia, v.60, p.82-87, 1987.
47. 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.
48. 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.
49. KALLIOMENI, O.P.; PUNNONEN, R.; MATILA, J.; LEHTINEN, M.; KOIVULA, T. Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. **Cancer**, Philadelphia, v.61, p.334-339, 1988.

50. KATEMENSKI, L. & MELAMED, M. Spectrophotometer cell sorter. **Science**, v.156, p.1364-65, 1967.
51. KHOO, S.K.; BATTISTUTTA, D.; HURST, T.; SANDERSON, B.; WARD, B.G.; FREE, K. The prognostic value of clinical, pathological, and biologic parameters in ovarian cancer. **Cancer**, Philadelphia, v.72, p.531-37, 1993.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. KLEMI, P.J.; JOENSUU, H.; KILHOLMA, P.; MÄENPÄÄ, J. Clinical significance of normal DNA content in serous ovarian tumors. **Cancer**, Philadelphia, v.62, p.2005-10, 1988.
57. 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.
58. 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.
59. KUSAMA, S.; WADA, T.; SAIGUSA, M. Diagnosis and treatment of Gastric Cancer. **Kanehara-Shuppan**, Tokyo, 1982.
60. KUWANO, H.; SUGIMACHI, K. DNA analysis and prognosis of digestive tract cancers. **Semin Surg Oncol**, Philadelphia, v.6, n.1, p.38-45, 1990.

61. LARSIMONT, D.; KISS, R.; DE LAUNOIT, Y.; MELAMED, M.R. Characterization of the morphonuclear features and DNA ploidy of typical and atypical carcinoma and small cell carcinomas of the lung. **Am J Clin Pathol**, Philadelphia, v.4, p.378-88, 1990.
62. MAYALL, B.H. Current capabilities and clinical applications of image cytometry. **Cytometry Supplement**, New York, v.3, p.78-84, 1988.
63. 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.
64. MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. São Paulo: Pedagógica Universitária, 1980.
65. 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.
66. MINCIS, M. **Gastroenterologia e hepatologia: diagnóstico e tratamento**, 1º ed., Lemos Editorial, São Paulo, p.343-56, 1997.
67. 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.
68. OPFERMAN, M.; BRUGAL, G.; VASSILAKOS, P. Cytometry of breast carcinoma significance of ploidy balance and proliferation index. **Cytometry**, New York v.8, p.217-224, 1987.
69. PARANÁ, Governo do Estado. **Normas para apresentação gráfica de dados: tabelas**. Curitiba, IPARDES, 1996.
70. PASTEELS, J.; LISON, L. La teneur en acide désoxyribonucléique des noyaux au repos. **C R Assoc Anat**, v.37, p.375-380, 1950.
71. 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.
72. ROBBINS, S. & COTRAN, R. **Patologia estrutural e funcional**, 2ª ed., Interamericana, Rio de Janeiro, 1983.

73. RODENBURG, C.J.; PLOEM-ZAAIJER, J.J.; CORNELISSE, C.J.; MESKER, W.E.; HERMANS, J.; HEINTZ, P.A.M.; PLOEM, J.S.; FLEUREN, G.J. Use of DNA image cytometry in addition to flow cytometry for the study of patients with advanced ovarian cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v.47, p.3938-3941, 1987.
74. 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.
75. 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'Agrégé de l'Enseignement Supérieur - **Université Libre de Bruxelles**, 1993.
76. SCHWARTZ, S.; SHIRES, G.; SPENCER, F.; STORER, E. **Princípios de cirurgia**, 4ª 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 tis 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 EIDJEN, A.; ZANDONA, C.; ROELS, H.; PASTEELS, J.; SCHULMAN, C.; KISS, 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. VOLM, M.; BRUGGEMANN, A.; GÜNTHER, M.; KLEINE, W.; PFLEIDERER, A.; VOGT-SCHADEN, M. Prognostic relevance of ploidy, proliferation, and resistance-predictive tests in ovarian carcinoma. **Cancer Research**, Baltimore, v.45, p.5180-5185, 1985.
85. WENGER, C.R.; BEARDSALEE, S.; OWENS, M.A.; POUNDS, G.; OLDAKER, T.; VENDELY, P.; PANDIAN, M.R.; HARRINGTON, D.; CLARK, G.M.; McGUIRE, W.L. DNA ploidy, S-phase and steroids receptor in more than 127,000 breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, v.9, p.20-28, 1993.
86. YONEMURA, Y.; MATSUMOTO, H.; NINOMIYA, I.; OHOYAMA, 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.
87. 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.
88. YONEMURA, Y.; OYOYAMA, 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.
89. 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.
90. 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.
91. ZANDONA, C.; BUDEL, V.M.; LARSIMONT, D.; PETEIN, M.; GASPERIN, P.; PASTEELS, J.L.; KISS, R. Digital cell image analysis of Feylgen-stained nuclei form papillary, medullary, colloid, lobular and comedocarcinomas of the breast. **Anticancer Res**, Athens, v.14, p.2173-82, 1994.