

VALCINIR BEDIN

**RELAÇÃO ENTRE TEXTURA MICROSCÓPICA CELULAR
E DADOS CLÍNICOS NO MELANOMA MALIGNO**

CAMPINAS

Unicamp

2009

VALCINIR BEDIN

**RELAÇÃO ENTRE TEXTURA MICROSCÓPICA CELULAR
E DADOS CLÍNICOS NO MELANOMA MALIGNO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração Anatomia Patológica

ORIENTADOR: PROF. DR. KONRADIN METZE

CAMPINAS

Unicamp

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

B39r Bedin, Valcinir
 Relação entre textura microscópica celular e dados
 clínicos no melanoma maligno / Valcinir Bedin. Campinas,
 SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Konradin Metze
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Morfologia. 2. Tumores. 3. Citometria por Imagem.
4. Melanoma. 5. Prognóstico. I. Metze, Konradin.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Cellular microscopic texture and clinical data in malignant melanoma

Keywords:

- Morfology
- Tumors
- Image citometry
- Melanoma
- Prognostic

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Área de concentração: Anatomia Patológica

Banca examinadora:

Prof. Dr. Konradin Metze

Prof^a. Dr^a. Maria Leticia Cintra

Prof^a. Dr^a. Aparecida Machado de Moraes

Prof^a. Dr^a. Maria Valéria Robles Velasco

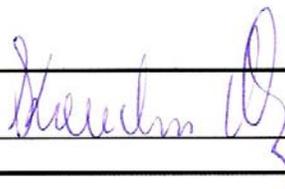
Prof. Dr. André Rolim Baby

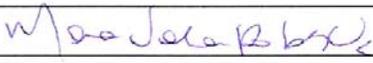
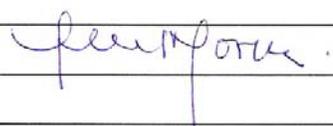
Data da defesa: 15-01-2010

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Valcinir Bedin

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Konradin Metze



Membros:	
Professor (a) Doutor (a) André Rolim Baby	
Professor (a) Doutor (a) Maria Valéria Robles Velasco	
Professor (a) Doutor (a) Maria Leticia Cintra	
Professor (a) Doutor (a) Aparecida Machado de Moraes	

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/01/2010

*Dedico este trabalho
a todos aqueles, que,
aleijados da cultura e do conhecimento
nada podem fazer para mudar o
triste curso de sua história.*

AGRADECIMENTOS

Meus primeiros agradecimentos ao Prof. Dr. Konradin Metze, personagem essencial nesta fase da minha vida, sem o qual nada disso teria acontecido.

Ao Randall Adam, que nunca se cansou da minha insistente falta de conhecimento em informática.

Ao Fernando Soares, sem cuja colaboração não poderia levar adiante este trabalho.

Ao Gilles Landman, que soube me compreender e cuja ajuda foi imprescindível.

À Bianca de Sá, pela colaboração na compilação dos dados.

À Sra Maria do Carmo Machado, sempre presente nas minhas necessidades.

Ao jovem Adriano Rios, que me ajudou na compilação dos dados.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica, pela ajuda, sempre que necessário.

Aos meus alunos, pelo estímulo indireto.

À minha esposa e companheira Maria Cristina, que soube compreender a dimensão deste trabalho sem questionamentos, como só quem ama faz.

Aos pacientes, sem os quais este trabalho não existiria.

*Onde está o conhecimento.
Nos livros, ou na cabeça dos homens?
Seria o livro o sábio,
ou seria quem o lê?*

*Nada mais nefasto do que
um leitor incompetente
para uma nobre obra.*

(provérbio judaico)

Introdução: Fatores prognósticos no melanoma maligno são, atualmente, baseados em dados clínicos e análise morfológica. Estas características clínico-patológicas, apesar de serem marcadores prognósticos robustos e reprodutíveis, não servem para prever o desfecho clínico para um paciente isolado. O estudo de núcleos em preparados histológicos ou citológicos revela informações importantes sobre a fisiologia celular e, além disso, é de grande importância diagnóstica e prognóstica. Estudos anteriores demonstraram que as características fractais têm importância prognóstica em neoplasias. O objetivo deste estudo foi investigar se a dimensão fractal da cromatina nuclear de melanomas malignos, medida em preparados histológicos de rotina, poderia ser um fator prognóstico para a sobrevivência.

Métodos: Foram examinados 71 espécimes de melanoma cutâneo primário e metastático, com pelo menos 1 milímetro de espessura, de pacientes com um mínimo de 5 anos de acompanhamento. A área nuclear, o fator forma e a dimensão fractal da textura da cromatina foram obtidos a partir de imagens digitalizadas de lâminas coradas por H & E. O nível de Clark, a espessura do tumor e o índice mitótico também foram determinados.

Resultados: O tempo de seguimento médio foi de 104 meses. A espessura do tumor, o nível de Clark, o índice mitótico, a área nuclear e a dimensão fractal tiveram valores significativos no prognóstico quando aplicada a regressão de Cox univariada. Ao realizar a regressão de Cox multivariada, estratificada pela presença ou ausência de metástases ao diagnóstico, apenas o nível de Clark e dimensão fractal da cromatina foram incluídos como fatores prognósticos independentes no modelo final.

Conclusão: Em geral, um comportamento mais agressivo é geralmente encontrado em neoplasias geneticamente instáveis, com um maior número de alterações genéticas ou epigenéticas, que, por outro lado, leva a um rearranjo da cromatina mais complexo. A dimensão fractal nuclear aumentada, encontrada em melanomas mais agressivos, é o equivalente matemático de uma arquitetura de cromatina com maior complexidade. Há fortes indícios de que a dimensão fractal da textura da cromatina nuclear pode ser uma variável nova e promissora em modelos de prognóstico do melanoma maligno.

Background: Prognostic factors in malignant melanoma are currently based on clinical data and morphologic examination. These clinical pathological features, although robust and reproducible prognostic markers, cannot accurately predict the clinical outcome for a single patient. Examination of nuclei in histological or cytological preparations reveals important information on cell physiology and, furthermore, is of great diagnostic and prognostic importance. Previous studies demonstrated that fractal characteristics are of prognostic importance in neoplasias. The aim of this study was to investigate whether the fractal dimension of nuclear chromatin measured in routine histological preparations of malignant melanomas could be a prognostic factor for survival.

Methods: We examined 71 primary cutaneous and metastatic melanoma specimens with at least 1mm thickness, from patients with a 5 year minimum follow up. Nuclear area, form factor and fractal dimension of chromatin texture were obtained from digitalized images of H&E stained of tissue micro array section. Clark's level, tumor thickness and mitotic rate were also determined.

Results: The median follow-up was 104 months. Tumor thickness, Clark's level, mitotic rate, nuclear area and fractal dimension were significant at worse prognostic factor in univariate Cox regressions. When performing multivariate Cox regression, stratified for the presence or absence of metastases at diagnosis, only the Clark level and fractal dimension of the chromatin were included as independent prognostic factors in the final model.

Conclusion: In general, a more aggressive behavior is usually found in genetically unstable neoplasias with a higher number of genetic or epigenetic changes, which on the other hand, provoke a more complex chromatin rearrangement. The increased nuclear fractal dimension found in more aggressive melanomas is the mathematical equivalent of a chromatin architecture with higher complexity.

We would like to conclude that there is strong evidence that the fractal dimension of the nuclear chromatin texture might be a new and promising variable in prognostic models of malignant melanomas.

LISTA DE ABREVIATURAS

- HPF:** “High Power Field” (campo de maior aumento)
- MM:** Melanoma Maligno
- TMA:** “*Tissue Microarray*”
- FFT :** “Fast Fourier Transformed” (Transformada de Fourier)
- PIXEL:** “Picture element” (menor ponto da imagem)
- BITMAP:** Mapa de “*bits*”- linguagem de codificação de imagem sem compressão
- FD:** Dimensão fractal
- FF:** “*Form factor*”

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Classificação TNM do Melanoma, segundo <i>American Joint Committee on Cancer, 2002</i>	55
Tabela 2 Estadiamento clínico do Melanoma, segundo <i>American Joint Committee on Cancer, 2002</i>	56
Tabela 3 Distribuição dos pacientes com melanoma cutâneo extensivo superficial de acordo com estadiamento ao diagnóstico segundo AJCC 2002.....	69

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Floco de neve de Koch.....	42
Figura 2: Fotografia do bloco e da lâmina de TMA de melanomas cutâneos extensivos superficiais invasivos.....	54
Figura 3: Fotografia digital de lâmina de melanoma corada com H&E.....	57
Figura 4: Núcleo segmentado de célula de melanoma.....	57
Figura 5: Núcleo segmentado de melanoma em escala de cinza.....	58
Figura 6: Exemplo de maior corda.....	60
Figura 7: Transformação do núcleo segmentado em imagem pseudo 3D.....	60
Figura 8: Modelo de obtenção da FD por meio de <i>box counting</i>	62
Figura 9: Representação esquemática da obtenção da dimensão Fractal.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

		Pág.
Gráfico 1	Diagrama de log X log da textura de imagem.....	62
Gráfico 2	Gráfico da distribuição dos pacientes por sexo.....	67
Gráfico 3	Tempo de acompanhamento dos pacientes.....	68
Gráfico 4	Localização dos tumores primários.....	69
Gráfico 5	Distribuição dos tumores por estágio.....	70
Gráfico 6	Distribuição dos pacientes de acordo com a espessura dos Tumores.....	70
Gráfico 7	Distribuição dos pacientes pelo nível de Clark.....	71
Gráfico 8	Distribuição dos pacientes de acordo com a idade no diagnóstico.....	72
Gráfico 9	Distribuição dos pacientes pelo índice mitótico.....	73
Gráfico 10	Obtenção da dimensão fractal.....	75

	Pág.
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	Xv
1- INTRODUÇÃO.....	29
1.1- Melanoma maligno.....	31
1.2- Textura e função biológica.....	36
1.3- Análise da Imagem.....	39
1.4- Dimensão fractal.....	41
1.5- Técnica de <i>Tissue Microarray</i>-TMA.....	44
2- OBJETIVOS.....	47
2.1- Geral.....	49
2.2- Específicos.....	49
3- PACIENTES E MÉTODOS.....	51
3.1- Pacientes.....	53
3.2- Análise histológica.....	53
3.3- Aquisição das imagens.....	56
3.4- Análises estatísticas.....	63
3.5- Aprovação pelo Comitê de Ética.....	63

4- RESULTADOS.....	65
4.1- Estatística descritiva.....	67
5- DISCUSSÃO.....	77
6- CONCLUSÃO.....	87
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

1.1- Melanoma Maligno

A começar pela designação aparentemente redundante de melanoma maligno (histórica, pois não há melanoma não maligno), a introdução deste termo nos leva a considerá-la a neoplasia mais agressiva da pele [1]. Esta neoplasia atinge não apenas adultos, mas também crianças e adolescentes [2].

Dados do INCA - Instituto Nacional do Câncer revelam, no Brasil, a incidência de melanoma variando de zero a 8,73 por 100.000 habitantes, sendo estimados, para 2010, 5.930 casos, compostos por 2960 homens e 2.970 mulheres. O número de mortes em 2007 foi de 1.296, sendo 753 homens e 543 mulheres, com a maior taxa de incidência no Estado de Santa Catarina (Ministério da Saúde).

A idade média ao diagnóstico de melanoma maligno na população geral é de 57 anos para os homens e de 50 anos para as mulheres. Em casos de melanoma hereditário, os indivíduos de alto risco podem ter essa média antecipada para 36 anos em homens e 29 anos para as mulheres. Além da idade mais precoce ao diagnóstico, os pacientes com melanoma familiar têm maior incidência de múltiplos melanomas primários.

Nos países desenvolvidos, o melanoma ocorre com predominância no sexo feminino. A forma anatomopatológica mais frequente é o tipo extensivo superficial, correspondendo a 70% dos casos. A localização varia de acordo com o sexo, sendo mais frequente nos membros inferiores nas mulheres e no tronco nos homens [1,3].

O melanoma cutâneo origina-se da transformação dos melanócitos epidérmicos, cuja principal função é a produção da melanina, pigmento que confere fotoproteção à pele [4,5]. Estes também atuam como células sensoriais e regulatórias, através da indução de respostas neuroendócrinas e imunomodulatórias, participando, deste modo, da manutenção da homeostase cutânea [6]. Os melanócitos humanos, na idade adulta, estão normalmente

quiescentes e podem apresentar atividade mitótica discreta com a ação de estímulos externos específicos, como a radiação ultravioleta e a cicatrização [5,6]. Esta atividade proliferativa requer controle delicado do ciclo celular, e as alterações em seus sinais regulatórios podem resultar em divisão celular não controlada, podendo representar o início de processo de transformação maligna dos melanócitos. Esta transformação é, provavelmente, multifatorial, e resulta de interações complexas entre fatores genéticos, constitucionais e ambientais [7].

O melanoma cutâneo é uma neoplasia que permite o estudo de eventos celulares relevantes para a transformação maligna, pois sua história natural demonstra estágios progressivos de agressividade do tumor, de acordo com a sua capacidade de infiltrar a derme [7,8,9,10,11,12]. Esta característica do tumor baseia-se no fato de que a transição do padrão de crescimento radial para o vertical, com infiltração da derme, é um marco de grande importância em várias das propriedades biológicas do tumor, incluindo sua capacidade de produzir metástases [11].

Assim como na maioria das neoplasias malignas em humanos, o desenvolvimento do melanoma cutâneo resulta do rompimento da integridade do genoma dos melanócitos, que induz instabilidade, produzida por alterações cromossômicas [7,8,11]. A gênese dos tumores envolve alterações dinâmicas do genoma, produzidas por mutações que determinam ganho de função de oncogenes ou perda de função de genes supressores de tumor [13]. Este processo ocorre em etapas, determinando a transformação progressiva da célula normal em célula neoplásica [13].

Os quatro maiores tipos de melanoma são o lentigo maligno melanoma, o melanoma lentiginoso acral, o melanoma extensivo superficial e o melanoma nodular [5].

O lentigo maligno melanoma tem margens irregulares e, geralmente, ocorre em áreas expostas ao sol, em pacientes mais idosos. O lentiginoso acral acomete as mãos e pés e, frequentemente, apresenta invasões massivas quando ocorre a fase de crescimento vertical. A forma mais comum entre os caucasianos

é a do melanoma superficial, que afeta o tronco e as extremidades e têm cores variadas. O melanoma nodular é fortemente pigmentado e cresce rapidamente.

Mais de 95% dos melanomas que envolvem a pele pertencem a um dos quatro tipos principais. Entretanto existe um grupo pequeno, mas importante, de melanomas cutâneos que podem ser classificados como variantes não usuais. São os melanomas desmoplástico, neurotrópico, pedunculado, metastático, amelanótico, o que surge sobre um nevo benigno, regressivo (“invisível”), e de células em balão. Outras lesões podem simular o melanoma histopatologicamente e algumas técnicas como a imunistoquímica com a marcação para proteína S-100, vimentina, queratina e HMB-45 podem ajudar a distinguir estas lesões do melanoma verdadeiro [1].

Para efeitos de prognóstico, uma das avaliações mais importantes leva em consideração o conceito de “micro-estágio”, determinado pelo nível de invasão de Clark (nível I= lesões intra-epidérmicas e epitélio anexial; nível II= invasão até derme papilar; nível III= preenche toda a derme papilar sem invadir a derme reticular; nível IV= invasão da derme reticular e nível V= invasão da hipoderme). Outra avaliação é a medida de espessura de Breslow (do topo da camada granular da epiderme até a extensão mais profunda do tumor). A associação entre a correlação clínico-patológica e as medidas microscópicas mostra-se útil no prognóstico [1,14].

É fundamental que se obtenha uma biópsia para se ter um diagnóstico histopatológico da lesão pigmentada da pele. A biópsia excisional total é o procedimento de escolha na remoção de uma lesão com suspeita de melanoma. Além disso, a biópsia do linfonodo sentinela tem sido usada para melhorar o diagnóstico [15].

Nas duas últimas décadas, muitos outros fatores morfológicos e biológicos vêm sendo investigados, como algumas características morfométricas, número de regiões organizadoras nucleolares [16, 17], expressão da proteína p53, indicadores de taxa de apoptose [18], expressão da proteína bcl-2 [19], expressão

de moléculas de adesão [20] e marcadores de proliferação celular [21,22]. Esses métodos, apesar de eficientes, são custosos e necessitam de laboratórios especiais com pessoal altamente treinado.

A análise morfométrica computadorizada foi pouco estudada, e o nosso entendimento é de que este tipo de avaliação pode trazer grande contribuição ao conhecimento destes tumores e ao seu grau de agressividade.

A análise da imagem pelo computador pode prever a sobrevivência de pacientes com neoplasias malignas, com alto grau de acurácia e com menos subjetividade que o exame visual [23]. Contudo, não se deve entender a patologia quantitativa como sinônimo de diagnóstico automático, e nem que a responsabilidade do patologista deva ser assumida sobre os aplicativos computacionais.

A forma mais comum de se processarem as imagens tem como princípio trabalhar com as imagens originais, isto é, concentrando o trabalho na intensidade e na distribuição dos graus de cinza em cada região de interesse da figura.

Assim, inúmeras informações podem ser obtidas, tais como distância entre dois pontos, áreas, ângulos, contagem de elementos como células, núcleos, mitoses, entre outros [24].

O processamento automático de imagens e a quantificação de características morfológicas de células têm um duplo benefício. Primeiro, o processo pode permitir *screening* automatizado; segundo, tornar os critérios de diagnósticos mais objetivos e reprodutíveis [26]. Há mais de 30 anos, alguns sistemas têm sendo desenvolvidos para o *prescreening* de preparados citológicos, incluindo uso de técnicas de processamento de imagens [25]. Apesar do grande número de algoritmos desenvolvidos, poucos sistemas comerciais foram desenvolvidos, ainda assim, com baixa aceitação no mercado.

Imagens de células coradas são heterogêneas e complexas, e pode ser difícil classificá-las devido à grande quantidade de agregados celulares e superposições.

Os parâmetros da análise de imagem podem ser usados com a vantagem de se perceberem pequenas mudanças na substância celular, que podem ser invisíveis, ou que são difíceis de se incluírem numa descrição qualitativa [27]. Há estruturas, vistas na microscopia óptica e eletrônica, que não poderiam ser rapidamente classificadas pelo uso de parâmetros simples como comprimento, área e circunferência, especialmente se sua aparência geral puder ser descrita por meio de características texturais.

Na última década, a literatura científica tem registrado trabalhos que associaram a tecnologia computacional e a histologia. Entre eles, temos o uso da microscopia epiluminescente automatizada [28] e a utilização de múltiplos marcadores citométricos, como microdensitometria de DNA, cariometria, AGNOR e MIB1-Ki67 para a avaliação de malignidade em lesões pigmentadas [29].

Encontramos ainda, estudos sobre a análise da contagem tissular de secções histológicas de melanoma, associadas à forma e ao tamanho da máscara de contagem [30] e avaliação dos componentes da biópsia cutânea por meio do CART (Classificação e Árvore de Regressão) [31]. Outro estudo demonstrou a associação anátomo-clínica de neoplasias cutâneas melanocíticas através da análise dermatoscópica [32].

Mijovic Z & Mihailovic D, 2002, [33] usaram a análise discriminante das variáveis cariométricas para fazer distinção entre lesões cutâneas melanocíticas malignas e benignas. A dimensão fractal de clones de melanoma em camundongos K1735 foi estudada por Ahammer et al [34].

Alguns estudos foram feitos no sentido de separar lesões pigmentadas, de caráter benigno, do melanoma. Oka et al, 2004, [35] apresentaram um estudo demonstrando parâmetros dermatoscópicos para a diferenciação do melanoma

com o nevo de Clark, utilizando a análise discriminante linear. Rubegni et al, 2001, [36] estabeleceram diferenças entre o nevo pigmentado de Spitz e o melanoma pela dermatoscopia digital e análise discriminante. Um método automatizado para a quantificação e análise fractal da imuno-histoquímica foi *estudado* por Gerger et al, 2004 [37]. Um estudo da vascularização e da dimensão fractal da interface dermo-epidérmica na psoríase gutata e em placas foi feito por Uhoda et al, 2005, [38]. Os parâmetros citomorfométricos e o potencial metastático do melanoma cutâneo e uveal, comparando com fatores prognósticos, foi desenvolvido por Pereira FB et al, 2001 [39].

Os recursos disponíveis em programas comerciais (por exemplo, KS-300[®]) restringem-se a parâmetros morfométricos elementares, tais como diâmetro, área, perímetro [40], que, *per se*, ajudam a objetivar, porém não conseguem “medir” conjuntos morfológicos mais complexos, como, por exemplo, a imagem dos núcleos.

Considerando que uma imagem digital de um núcleo é composta por *pixels* com graus de cinza formando um padrão, a textura nuclear depende da relação espacial de cada *pixel* com os *pixels* vizinhos no núcleo. Desta forma, as medidas de textura podem ser estudadas como propriedades estatísticas de uma imagem.

1.2- Textura e função biológica

A textura é uma característica que descreve a aparência genérica de parte de uma imagem e é, frequentemente, expressa como aparência macia, arenosa, regular, grosseira, granular etc [25].

A textura da imagem histológica ou citológica dos tecidos está intimamente relacionada com o estado fisiológico e com o distúrbio fisiopatológico do organismo, o que é a base da análise microscópica.

A textura da cromatina dos núcleos está relacionada com fenômenos epigenéticos, tais como metilação ou modificação das histonas, que remodela profundamente a arquitetura nuclear característica de cada tipo de tecido. Mudanças fisiológicas ou patológicas podem, ainda, influenciar neste processo, explicando a grande variedade de estrutura da cromatina [41, 42, 43, 44].

Portanto, o estudo da textura nuclear tornou-se cada vez mais importante para a histopatologia e citopatologia. Deshabhoina et al, 2003, [45], publicaram um estudo em que utilizaram a diferenciação das características de textura para separar melanoma e queratose seborréica. Outro estudo focou na detecção da rede de pigmentos utilizando imagens dermatoscópicas e aplicando a análise de textura [46]. O tamanho, a forma e a textura dos núcleos demonstraram ser de fundamental importância na avaliação citológica de malignidade [47, 48].

Outro instrumento de citologia analítica computadorizada é a transformada de Fourier. Ela foi utilizada para a análise de textura da epiderme na síndrome de Sjögren-Larsson [49]. Chapman JA et al, 2007 [50], estudaram, através da análise de imagem, a heterogeneidade da textura do núcleo no carcinoma de mama ductal *in situ* e a sua correlação prognóstica. Diaz G et al, 1997 [52], estudando medidas de textura nuclear, utilizaram o conceito de variograma para acessar imagens digitalizadas de núcleos de neurônios apoptóticos, e demonstraram uma associação entre as alterações nucleares e o processo degenerativo. Guillaud M et al, 2005 [54], publicaram estudo demonstrando que a positividade para o vírus do papiloma humano (HPV) está correlacionada com alterações subvisuais da textura de cromatina no epitélio cervical.

Estudos com células prostáticas demonstraram a utilidade da análise da textura de cromatina na diferenciação de células malignas e benignas [55, 56]. Isitor GN e Thorne R, 2007 [57], compararam modelos de cromatina nuclear de imagens digitalizadas das células de testículo e de rins em mamíferos. Karaçali B e Tözeren A, 2007 [58], demonstraram a utilidade da detecção automática de regiões de interesse em tecido mamário, utilizando a análise de imagens em

experimentos com *tissue microarray*. Makarov DV et al, 2008, [59] utilizaram a morfometria nuclear para prever a necessidade de tratamento entre homens com câncer de próstata arrolados em um programa de tratamento.

No nosso meio, Mello MR et al, 2008, [60] estudaram os fenótipos da leucemia linfoblástica aguda e suas associações com diferentes texturas nucleares, concluindo que as alterações de textura refletem eventos moleculares diversos.

Existe ainda um forte componente subjetivo na histopatologia e na citopatologia, o que explica o considerável grau de discordância entre os especialistas, como os relatados da avaliação de textura no líquen plano oral [61], na progressão do adenocarcinoma de esôfago [62], nos epitelomas uroteliais de baixo potencial de malignidade [63], nas mudanças celulares causadas pelo papiloma vírus humano [64], nos carcinomas de pulmão [65].

Christopher & Hotz, 2004 [66], relatam essa subjetividade em seu estudo sobre diagnóstico citológico. Isso explica as tentativas de “objetivar” o processo diagnóstico, utilizando ferramentas matemáticas aplicadas na análise de imagens microscópicas, como no trabalho de Metze et al, 2005, [67]

Adam RL et al, 2004 [68], estudaram as características granulométricas dos eritroblastos como ferramenta diagnóstica nas doenças hematológicas. Ainda em 2004, outro estudo demonstrou que resíduos granulométricos podem ser utilizados como ferramenta diagnóstica em citologia [69]. Metze K et al, 2004 [70], demonstraram que a análise da textura de cromatina pode ser realizada pela entropia aproximada de Pinkus.

Descritores de textura nuclear são de grande utilidade na clínica médica. Estudos nesse sentido foram encontrados na literatura, como o feito para identificar texturas de cromatina em carcinoma basocelular como fator prognóstico [47]. Metze K et al, 2005, estudaram parâmetros derivados da transformada de Fourier na recorrência do carcinoma basocelular [71]. Outro estudo fez a análise

da textura de regiões organizadoras de nucléolos no câncer de pulmão [72] e, em 2008, Metzger K et al, compararam a textura de cromatina em adenomas foliculares e em nódulos hiperplásicos da tiróide [73].

1.3- Análise da imagem

Uma das vantagens do método de análise da imagem é poder diminuir a influência do subjetivismo no diagnóstico, reduzindo eventuais falhas humanas.

Como inconveniente à disseminação deste método temos o fato de que existem poucos algoritmos para diferenciar um número restrito de doenças. Falta ainda, na grande maioria dos casos, a validação externa.

Com a evolução dos estudos, foram desenvolvidos e implantados parâmetros novos, tais como entropia, parâmetros de simetria (do contorno e da superfície), aplicação da teoria dos grafos e da transformada de Fourier [74].

Neste último método, estuda-se a frequência espacial, que é a medida que expressa o ritmo das alterações da luminância que ocorrem numa sequência de pontos. Frequências espaciais altas correspondem a detalhes de brilho que variam rapidamente, e valores baixos representam mudanças lentas do brilho [75]. A distribuição das frequências representa a periodicidade da imagem e as interferências direcionais. As características de textura podem ser calculadas a partir das distribuições das frequências em diferentes regiões do espaço transformado.

Banda-Ganboa et al, 1993 [76], estudaram a análise espectral de células cervicais usando a transformada de Fourier. Concluíram que, quando utilizavam apenas as características da forma do núcleo, obtinham uma boa classificação, mas quando incluíram as informações relacionadas à textura, obtiveram uma classificação melhorada.

Smith et al, 1999 [77], utilizando o método de medida da similaridade para classificação de imagens diferentes, demonstraram que a transformada de Fourier pode classificar a arquitetura histológica de tumores de próstata com 97,2% de acerto na graduação de Gleason.

De Vries et al, 2000 [78], fizeram uso da FFT para estudar a organização dérmica nos casos de esclerodermia, e identificar fibrose na pele lesionada, bem como na pele saudável. Clark, 2001 [79], aplicando a transformada de Fourier a imagens da microscopia eletrônica, demonstrou que a distribuição ordenada de fibrilas de colágeno tipo I na córnea seria um exemplo de especialização na formação da ultra-estrutura funcional, e que a distribuição amorfa e desordenada das proteínas citoplasmáticas da esclera se assemelha à estrutura da maioria das células.

Estudo de Metze et al [80] deu a conhecer as diferenças de textura do tecido dérmico elastótico em pacientes de diferentes fototipos. Em outro trabalho, a análise de textura foi utilizada para se fazer a diferenciação entre quelóides e cicatrizes hipertróficas [81]. Ainda estudando quelóides e cicatrizes hipertróficas, a dimensão fractal foi aplicada em lâminas coradas pelo Masson para se fazer a distinção entre essas duas entidades [82].

A relação entre a textura de cromatina e o fenotipo nas leucemias agudas, foi estudada através da análise de imagens, em 2005 [83], e os autores concluíram que as leucemias, de origem B ou T, apresentaram diferenças significativas nas características de textura nuclear, provavelmente um reflexo dos eventos moleculares associados a diferenciação celular, padrão de metilação do gen ou apoptose .

Em 2008, Adam RL et al [84], trabalhando com núcleos de cardiomiócitos, fizeram ver que o pré-processamento das imagens é uma ferramenta útil na análise da textura da cromatina nuclear quando o seu estudo utiliza a transformada de Fourier.

Metze K et al, 2009 [85], descreveram que a cariometria vem tendo um papel muito importante na análise da textura nuclear, uma vez que as mudanças na cinética celular e, também, as alterações biológicas moleculares modificam a morfologia nuclear, especialmente a arquitetura da cromatina. Os dados cariométricos podem ajudar no diagnóstico diferencial e no prognóstico das doenças. As técnicas de análise computadorizada de imagens diminuíram os efeitos dos vieses dos observadores, e, portanto, têm tido uma importância maior. Esta tecnologia, entretanto, necessita de imagens de alta qualidade, além de cuidados com outras técnicas coadjuvantes como o corte das lâminas, a fixação e a coloração das mesmas, que precisam ser homogêneos.

1.4- Dimensão fractal

Um fractal (no passado conhecido como *curva monstro*) é um objeto geométrico que pode ser dividido em partes, cada uma das quais semelhante ao objeto original. Os fractais têm infinitos detalhes, são auto-similares e independem de escala. Em muitos casos um fractal pode ser gerado por um padrão repetido, tipicamente um processo recorrente ou iterativo.

Em 1872, Karl Weierstrass encontrou o exemplo de uma função com a propriedade de ser contínua em todo seu domínio mas em nenhuma parte diferenciável. O gráfico desta função é denominado atualmente de fractal.

Em 1904, Niels Fabian Helge von Koch, [86] não satisfeito com a definição muito abstrata e analítica de Weierstrass, deu uma definição mais geométrica de uma função similar, atualmente conhecida como *Koch snowflake* (ou floco de neve de Koch - Figura 1), que é o resultado de infinitas adições de triângulos *ao perímetro* de um triângulo inicial. Cada vez que novos triângulos são adicionados, o perímetro cresce, e fatalmente se aproxima do infinito. Dessa maneira, o fractal abrange uma área finita dentro de um perímetro infinito [87].

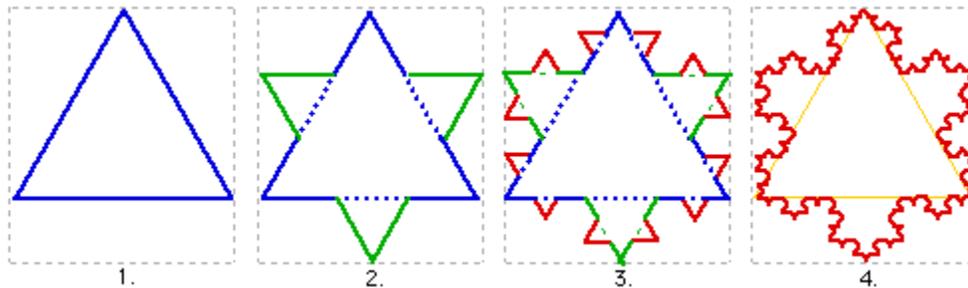


Figura 1- O floco de neve de Koch [adaptado de Dubuc B et al [87]

A geometria fractal é o ramo da matemática que estuda as propriedades e comportamento dos fractais. Descreve muitas situações que não podem ser explicadas facilmente pela geometria clássica, e foram aplicadas em ciência, tecnologia e até em arte gerada por computador. As raízes conceituais dos fractais remontam a tentativas de medir o tamanho de objetos para os quais as definições tradicionais baseadas na geometria euclidiana falham.

Esta ciência só conseguiu se desenvolver plenamente a partir da década de 60 do século XX, com o auxílio da computação. Um dos pioneiros a usar esta técnica foi Benoît Mandelbrot, um matemático francês nascido na Polónia, que criou o conceito de geometria fractal na década de 70 do século XX, e assim a denominou, a partir do adjetivo latino *fractus*, do verbo *frangere*, que significa quebrar [88].

Para explicar a ideia de que a dimensão não é necessariamente inteira, Mandelbrot [89] utilizou o seguinte exemplo:

Qual é a dimensão de um novelo de fio? Mandelbrot respondeu que isso depende do ponto de vista. Visto de grande distância, o novelo não é mais do que um ponto, com dimensão zero. Visto mais de perto, o novelo parece ocupar um espaço periférico, assumindo assim três dimensões. Visto ainda mais de perto, o fio torna-se visível, e o objeto torna-se de fato unidimensional, ainda que essa dimensão única se enovele em volta de si mesma de tal forma que ocupe um espaço tridimensional.

A noção de quantos números seriam necessários para especificar um ponto continua a ser útil. De muito longe, não é preciso nenhum - o ponto é a única coisa que existe. Mais perto, são necessários três. Mais perto ainda, um é suficiente - qualquer posição específica ao longo do fio é única, por mais que o fio esteja enovelado.

Muitos objetos naturais, incluindo a maioria dos objetos de estudo em patologia, têm características estruturais complexas, como por exemplo, a irregularidade das margens de um tumor, que podem ser estudadas utilizando-se o conceito de fractal.

Essas estruturas também têm padrões que se repetem em diferentes aumentos, uma propriedade chamada de auto-similaridade. Isso tem implicações importantes para medidas de parâmetros tais como o comprimento ou a área, uma vez que as medidas euclidianas podem ser invalidadas.

A dimensão fractal (FD) pode ser medida associando-se sistemas de análise de imagens. Alguns usos dos fractais incluem a medida das propriedades espaciais de tumores, vasos e neurônios [89].

Landini G, 1997 [90], utilizou simulações usando a função de Weiestrass-Mandelbrot para estudar infecções perodontais. Dioguardi N et al, 1999 [91], estudaram a importância da análise da dimensão fractal em fibrose hepática. Em 2007, Shapiro NA et al, [92], utilizaram a dimensão fractal para classificar tumores foliculares da tireóide, e, em 2008, Goutzanis et al [93], propuseram a dimensão fractal como fator prognóstico no carcinoma espinocelular oral.

Na literatura existem trabalhos em que a aplicação da FD da cromatina nuclear foi estudada, como no de Adam R et al, 2006, [94], no qual os autores investigaram a importância prognostica da FD em blastos de pacientes com leucemia linfoblástica B (B-ALL). Eles utilizaram o método de Minkowski-Bouligand e concluíram que a FD da cromatina pode ser vista como um fator prognóstico para pacientes com esta doença.

A dimensão fractal também foi utilizada para medir irregularidades dos núcleos e margens glandulares com o intuito de distinguir lesões malignas de benignas [95]. Lee TK et al 2003 [96], utilizando a FD, propuseram um índice de irregularidade, uma nova medida para lesões melanocíticas cutâneas.

A dimensão fractal de Minkowski-Bouligand foi utilizada para o diagnóstico diferencial das neoplasias foliculares da tireóide [97]. Outro trabalho abordou a regeneração tecidual óssea, processo que é difícil de se descrever objetivamente, uma vez que a histomorfometria não consegue caracterizar corretamente alterações qualitativas dentro da complexidade tissular. Nesse estudo os autores chegaram à conclusão de que o uso de métodos de análise de textura, como a dimensão fractal, podem ajudar a caracterizar a formação e o remodelamento do osso compacto neoformado [98].

Estudo realizado em nosso meio [99] utilizou a dimensão fractal obtida pelo método de Sarkar [100], para estudar os efeitos da injeção de silanol em pele humana. A análise de textura mostrou fibras de colágenos mais compactas e homoganeamente distribuídas após a aplicação do produto.

1.5- Técnica de *Tissue Micro Array* (TMA)

As técnicas de análise de material obtido para estudo de lesões melanocíticas têm limitação no número de amostras que podem ser estudadas simultaneamente [12].

A técnica de *tissue microarray* foi descrita em 1998 por Kononen et al [101] e permite a avaliação de centenas de amostras teciduais, fixadas em formalina em bloco de parafina, em uma única lâmina. Ela baseia-se na análise de amostras de tecidos em blocos de parafina que estão arquivadas. Desta forma, grande variedade de tumores, além de um número grande de amostras, podem ser estudadas.

Acrescente-se o fato de que as amostras podem ter sido coletadas há vários anos, permitindo a devida análise de dados, em relação ao acompanhamento e evolução clínica dos doadores dos tecidos estudados [102, 103].

A técnica de *tissue microarray* baseia-se na obtenção de amostras de blocos de parafina coletadas por meio de agulha (*punch*) com diâmetro de 0,6; 1,0; 1,5 ou 2,0mm, que são inseridas em um bloco receptor, através de um aparelho denominado *Tissue Microarrayer* [104].

Pode-se, assim, coletar até 700 espécimes em cada bloco receptor, com pouca mutilação do bloco de origem. O bloco receptor montado pode prover de 100 a 400 cortes de 5 a 8 μ , que podem ser analisados empregando-se grande variedade de reações histoquímicas e imunoistoquímicas.

A técnica do *tissue microarray* foi utilizada para se estudar a expressão de proteínas em lesões melanocíticas [105] e para investigar se o aumento da expressão da integrina-quinase (ILK) teria um papel na progressão do melanoma [106].

Pacifico MD et al, 2005 [107] montaram um TMA com 480 espécimes de 120 pacientes com melanoma primário e estudaram o marcador MCAM (molécula de adesão celular do melanoma). A identificação dos marcadores de adesão revelou ser um marcador prognóstico valioso e um alvo potencial para manipulação terapêutica.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Estudar método de análise de imagem histológica para prognóstico de melanoma.

2.2- Objetivos específicos

- 1- Avaliação morfométrica computadorizada de núcleos empregando programa de computador especialmente desenvolvido para determinar a dimensão fractal da cromatina, e relacioná-la com a sobrevida.
- 2- Comparar os padrões de textura de cromatina com outros fatores prognósticos em relação à sobrevida global.

3- PACIENTES E MÉTODOS

3.1- Pacientes

Foram selecionados pacientes com melanoma cutâneo extensivo superficial diagnosticados e tratados no Centro de Pesquisa e Tratamento do Câncer do Hospital AC Camargo entre os anos de 1994 e 2000.

Foram compiladas variáveis demográficas, clínicas, de estadiamento, de tratamento, de evolução e de *status*.

Os critérios de inclusão foram:

- 1- casos incluídos no *tissue microarray*;
- 2- acompanhamento detalhado e completo dos sobreviventes por, pelo menos, 60 meses;
- 3- dados clínicos da causa da morte dos não sobreviventes.

3.2- Análise histológica

Todos os casos foram revisados de acordo com o protocolo estabelecido pelo Grupo Brasileiro de Melanoma e pela Sociedade Brasileira de Patologia, seguindo critérios da Classificação TNM do Melanoma, segundo o *American Joint Committee on Cancer* (Tabelas 1 e 2). [108, 109]

Entre as diversas variáveis histológicas compiladas e listadas no anexo I, as seguintes foram utilizadas:

- Espessura do tumor;
- Nível de Clark [110];
- Índice mitótico (numero de mitoses por 10 campos de grande aumento) [111,112,113,114,115].

Dois blocos cilíndricos foram obtidos do tecido parafinado de cada tumor dentro de uma área previamente marcada e identificada usando um *tissue microrarrayer* (Beecher Instruments[®], Silver Spring, USA). Com uma agulha de 1.0mm, o material foi transferido para um novo bloco de parafina, de acordo com a técnica de Kononen et al [105]. As amostras incluíam 72 tumores primários (melanomas extensivos superficiais acima de 1mm). Uma lâmina de 6µm do bloco principal foi corada com H&E para análises futuras.

Por meio do mapa construído em planilha Excel[®], com identificação detalhada de cada cilindro, foi possível a localização precisa de cada caso no bloco de lâminas do TMA. (Figura 2)

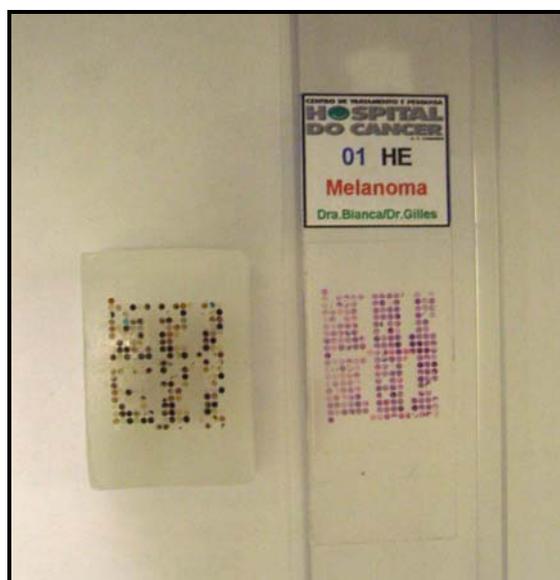


Figura 2- Fotografia do bloco e da lâmina do TMA de melanomas cutâneos extensivos superficiais invasivos

Tabela 1- Classificação TNM do Melanoma, segundo *American Joint Committee on Cancer, 2002*

T	Espessura	Ulceração
Tis	Melanoma <i>in situ</i>	
T1	≤ 1mm	a: sem ulceração e Clark II/III b: com ulceração ou Clark IV/V
T2	1,01 - 2mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2,01 - 4mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	> 4mm	a: sem ulceração b: com ulceração
N	Nº de linfonodos metastáticos	Infiltração tumoral do linfonodo
N1	1 linfonodo	a: micrometástase* b: macrometástase*
N2	2 ou 3 linfonodos	a: micrometástase* b: macrometástase* c: metástases em trânsito/satelitose sem metástase nodal
N3	4 linfonodos ou mais, ou linfonodos confluentes, ou metástases em trânsito/satelitose com metástase linfonodal	
M	Localização	DHL sérico
M1a	Metástase cutânea, subcutânea ou linfonodal à distância	Normal
M1b	Metástase pulmonar	Normal
M1c	Outras metástases viscerais Qualquer metástase à distância	Normal Elevada

*Micrometástases são diagnosticadas após realização de pesquisa do linfonodo sentinela ou linfadenectomia.

*Macrometástases são definidas como linfonodos clinicamente detectados e confirmados por linfadenectomia terapêutica ou quando as metástases linfonodais apresentarem infiltração extra-capsular.

Fonte: Adaptado de BALCH *et al.* (2001b) [108, 109]

Tabela 2- Estadiamento clínico do Melanoma, segundo *American Joint Committee on Cancer, 2002*

Estádio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	Qualquer T	N1	M0
IIIB	Qualquer T	N2a ou N2b ou N3	M0
IIIC	Qualquer T	N2c	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	Qualquer M

Fonte: Adaptado de BALCH *et al.* (2001b) [108,109]

3.3- Aquisição das imagens

A aquisição das imagens foi feita com uma câmera digital Leica DC 500[®] com alta resolução (12 megapixels) e com uma objetiva de óleo de imersão (x100). As imagens foram salvas sem compressão no formato bitmap 24-bit color. Pelo menos 150 núcleos de cada tumor, escolhidos ao acaso, foram adquiridos de cada caso, pelo mesmo operador, no melhor foco, isto é, no foco em que os contornos se apresentaram nítidos na maior parte do perímetro da carioteca (Figuras 3 e 4).

Foram seguidos os seguintes critérios:

- a) Somente foram adquiridos núcleos com características de células de melanoma, desprezando-se quaisquer outras células do campo.

b) Núcleos sem pregas, fendas e dobramentos.

c) Núcleos sem superposição de qualquer estrutura, por exemplo, bolhas, precipitação de corante ou outros núcleos.

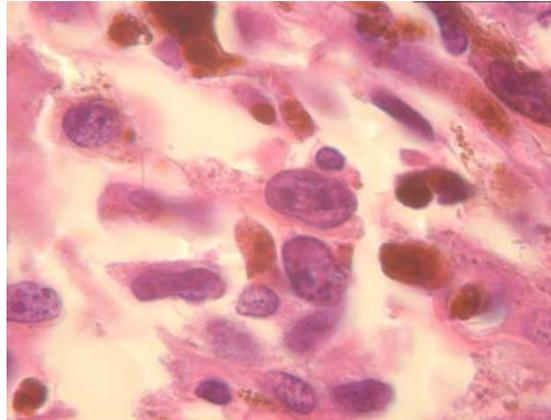


Figura 3- Fotografia digital de lâmina de melanoma corada com H&E

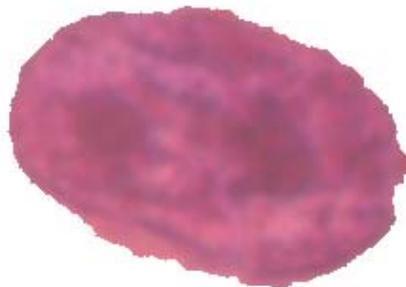


Figura 4- Núcleo segmentado de célula de melanoma

Os núcleos foram, então, convertidos para uma escala de cinza de 8 *bit*, por meio do cálculo da luminância. Para preparar a imagem para ser transformada, e para o cálculo da dimensão fractal, ela é convertida em escala de cinza, através do cálculo de luminância (Figura 5).

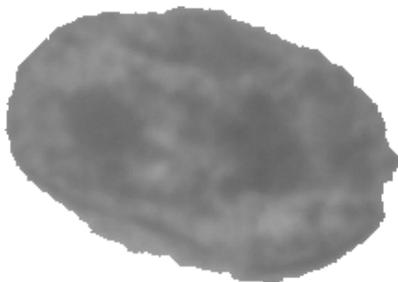


Figura 5- Núcleo segmentado de melanoma em escala de cinza

Finalmente calculamos as seguintes variáveis cariométricas de cada núcleo:

Área do núcleo;

Form factor (Fator de forma)-FF;

Maior corda;

Diâmetro transversal médio;

Dimensão fractal da cromatina de acordo com Sarkar.

As variáveis morfométricas descrevem aspectos relacionados à forma nuclear como área, perímetro, maior e menor diâmetro e fator de forma (também descrito como “*form factor*”).

A área do núcleo segmentado é facilmente calculada pelo programa do computador.

Entre os descritores morfométricos, o *form factor* é uma medida que tem uma relação linear inversa com o grau de irregularidade do contorno nuclear. Este valor pode ser obtido pela fórmula:

$$FF = 4 \pi A / P^2$$

onde A= área e P= perímetro.

Quanto mais próximo da forma arredondada, o *form factor* se aproxima de 1. Quanto mais distante da forma arredondada (por alongamento ou irregularidades no contorno), o fator de forma torna-se mais próximo de zero.

Portanto, o valor de FF de um círculo é 1,0. Valores <1,0 indicam diferentes graus de irregularidades na forma nuclear, com os valores mais baixos representando núcleos mais irregulares.

É possível se determinar a maior corda de um núcleo por meio de técnicas de morfologia matemática (Figura 6).

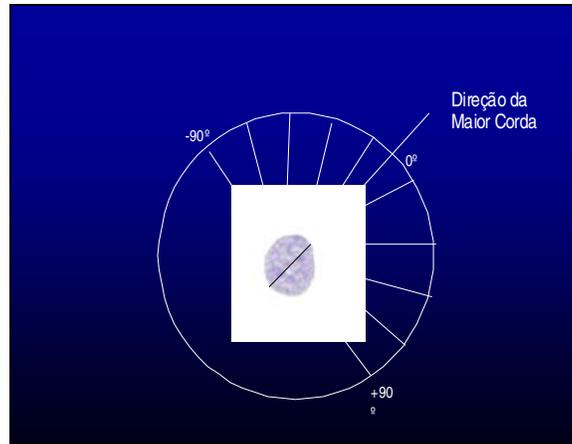


Figura 6- Exemplo de maior corda (adaptado de Bedin, V. Tese de Mestrado- Unicamp-2004 [47])

Após a normalização do histograma de valor de cinza para cada núcleo, uma imagem pseudotrídimensional foi criada com o eixo z definido pelo nível de cinza de cada pixel, transformando assim a textura de cromatina corada com hematoxilina-eosina em uma superfície rugosa. Esta imagem tem o aspecto de paisagem, sendo a parte mais escura representada pela menor altura e a parte mais clara pela maior (Figura 7).

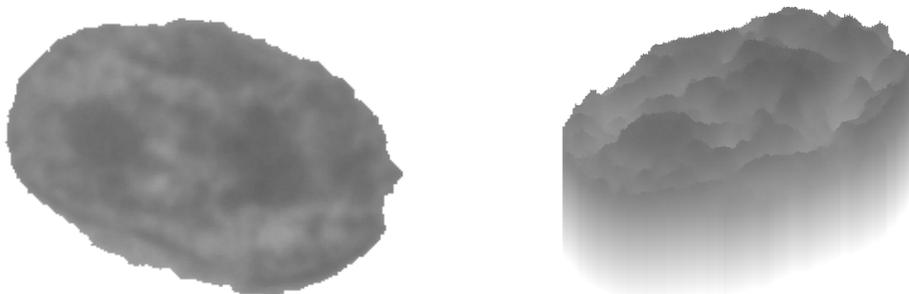


Figura 7- Transformação do núcleo segmentado em imagem pseudo 3-D

A dimensão fractal (FD) da superfície das imagens pseudo 3-D foi calculada de acordo com Sarkar através de um software desenvolvido por Dr Randall L Adam, nos laboratórios da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP.

Sarkar et al [100], em 1992, descreveram que, para se determinar a dimensão fractal (FD), devemos ter um valor de coordenadas x e y cujas dimensões correspondem a uma imagem do tipo $M \times M$, onde teremos M^2 pixels. A coordenada z denota o nível de cinza do pixel. Assim, os pares x, y indicam a posição na imagem, e a altura da superfície indica o nível de cinza.

Uma imagem é modelada então, como um relevo, onde as alturas representam os tons de cinza.

O espaço é, então, subdividido em "boxes" de lados $S \times S \times S$, onde S é um múltiplo do tamanho do *pixel* em (x,y) e S é múltiplo do nível de cinza unitário na direção z . Uma imagem com tamanho $M \times M$ *pixels* é dividida, no plano x,y , em *grids* de $S \times S$ *pixels* onde, $1 \leq S \leq M/2$ e S é um inteiro. Em cada *grid* há uma coluna de "boxes" $S \times S \times S$. Por exemplo, na Figura 8 temos a modelagem de parte de uma imagem no espaço, representada pela superfície externa (níveis de cinza da imagem). Nesta figura, a superfície da imagem foi representada de forma suave para facilitar a apresentação do método, na realidade teremos a superfície de uma imagem digitalizada que, em geral, é mais irregular.

De acordo com Sarkar et al [100], preenchemos o espaço com cubos e contamos o número de intersecções deles com a superfície. Este procedimento foi repetido com cubos menores ou maiores. Num diagrama bilogaritmado para cada um desses procedimentos, o número de intersecções é representado pelo valor no eixo y e o tamanho dos cubos, pelo valor no eixo x . A dimensão fractal pode assim ser obtida pela inclinação da linha de regressão linear (Gráfico 1).

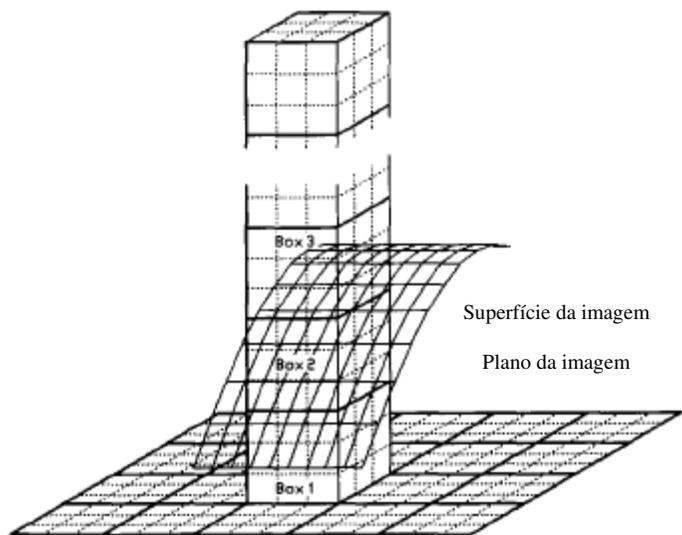


Figura 8- Modelo de obtenção da FD por meio de “box counting” (adaptado de Sarkar et al [117])

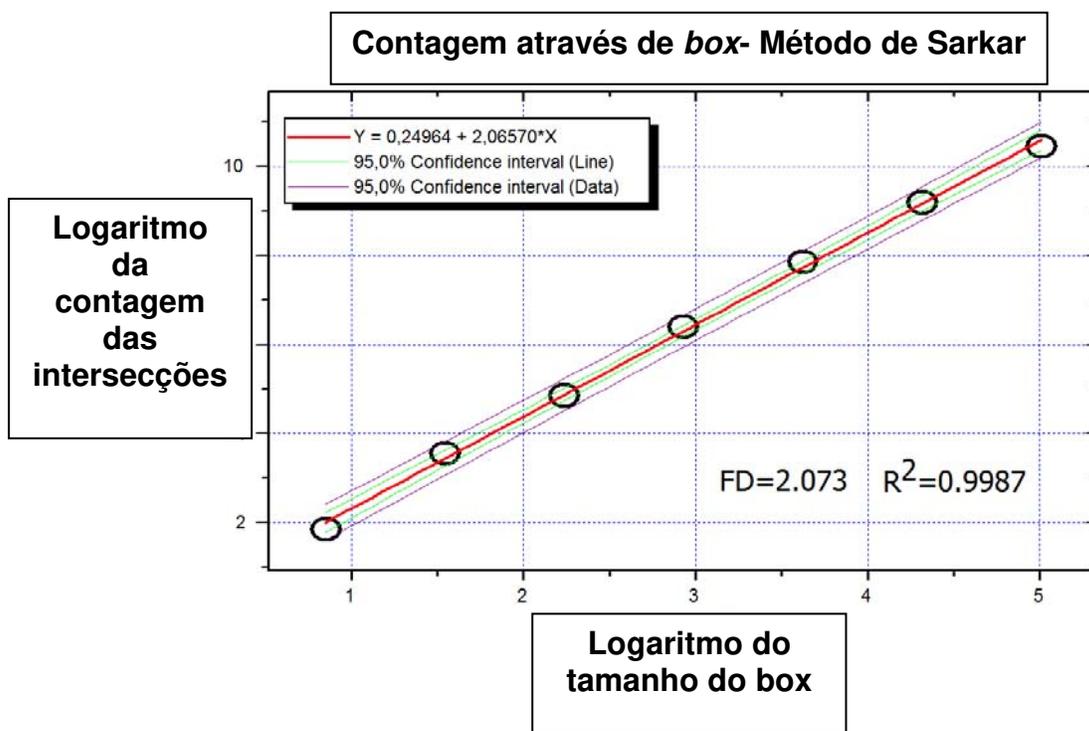


Gráfico 1- Diagrama de log x log da textura de imagem

3.4- Análises estatísticas

O tempo de observação foi contado desde a data do diagnóstico até o último contato (mínimo de 60 meses nos sobreviventes).

Curvas de tempo-evento foram analisadas de acordo com Kaplan-Meier e teste de log-rank, assim como a regressão de Cox univariada.

As variáveis que obtiveram $p < 0,10$ no modelo univariado da regressão de Cox foram testadas na análise multivariada.

Todas as análises foram realizadas com os programas Winstat e SPSS10.0.

3.5- Aprovação pelo Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo. (CONEP - 119149) em 13 de dezembro de 2006.

4- RESULTADOS

4.1- Estatística descritiva

O estudo foi realizado com 71 pacientes sendo 41 (57,8%) do sexo feminino e 30 (42,2%) do sexo masculino (Gráfico 2).

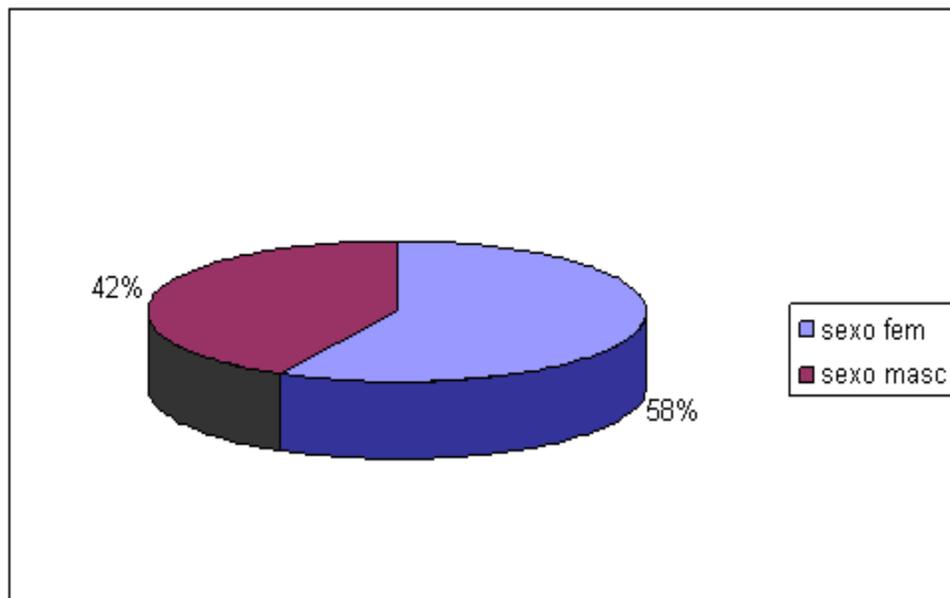


Gráfico 2- Gráfico da distribuição dos pacientes por sexo

O acompanhamento médio foi de 104 meses, com o mínimo de 8 e o máximo de 160 meses (Gráfico 3).

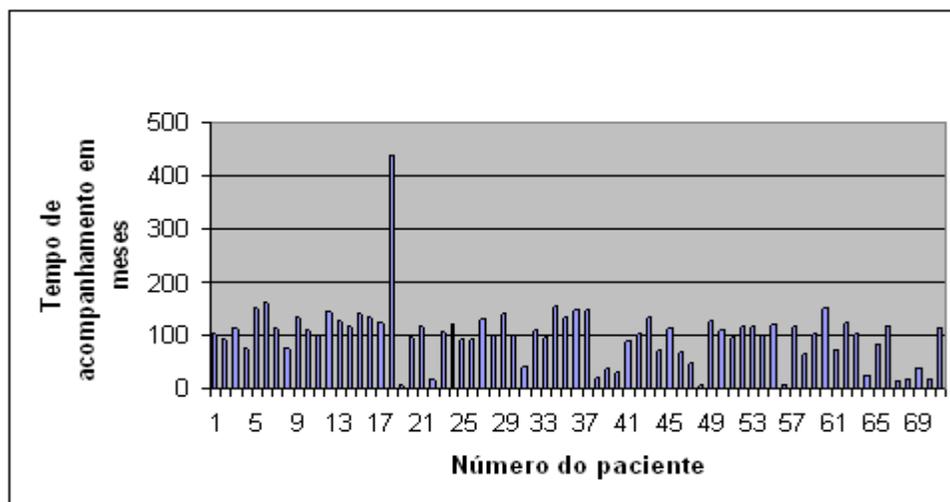


Gráfico 3- Tempo de acompanhamento dos pacientes

Tivemos 15 pacientes que morreram, no período do estudo, devido a doença disseminada.

O tumor primário estava localizado no tronco em 47.1% dos pacientes, 44,1% nas extremidades e 8,8% na cabeça e pescoço (Gráfico 4).

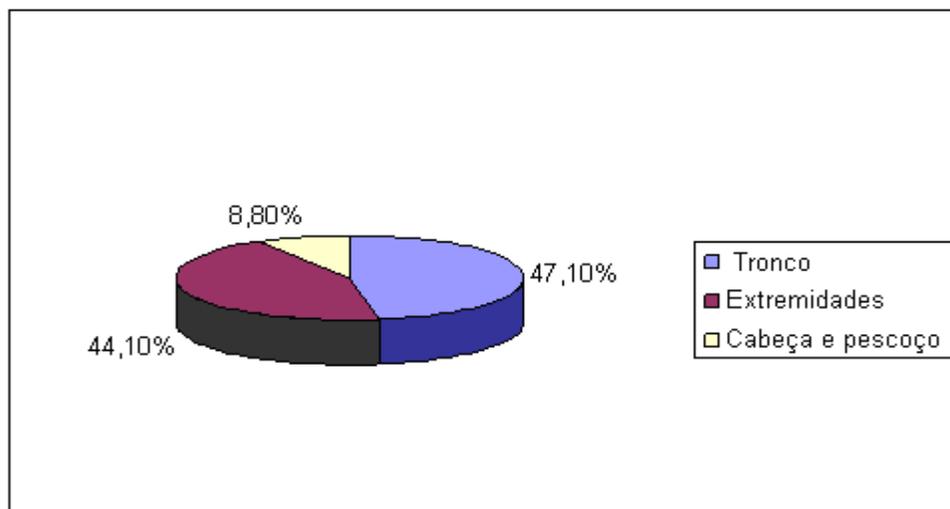


Gráfico 4- Localização dos tumores primários

A distribuição dos pacientes segundo o estadiamento está demonstrada na Tabela 3 e no Gráfico 5.

Tabela 3- Tabela da distribuição dos pacientes com melanoma cutâneo extensivo superficial de acordo com o estadiamento ao diagnóstico segundo o *AJCC 2002*.

Estádio	N de Casos	(%)
IIA	27	(38)
IIB	3	(4)
IIC	17	(24)
IIIA	7	(10)
IIIB	9	(13)
IIIC	8	(11)
Total	71	(100)

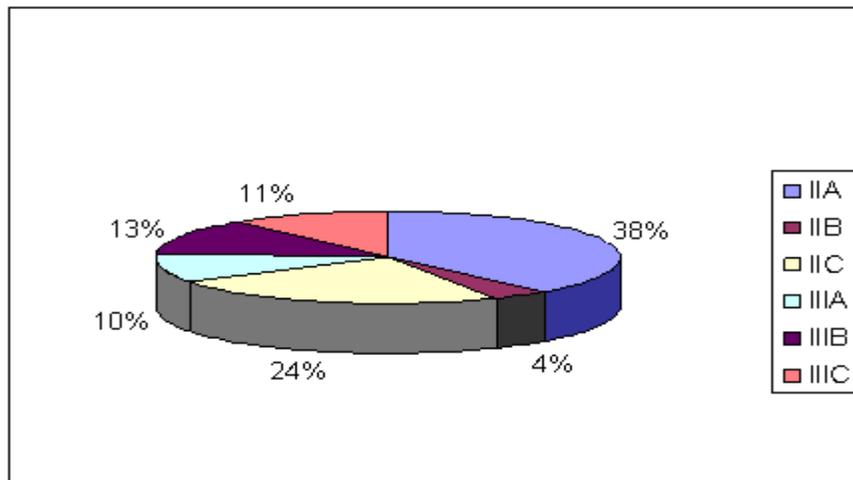


Gráfico 5- Distribuição dos tumores por estadios

A espessura tumoral foi medida entre 1,05mm a 17,0mm (média de 2,35mm) e foi um fator prognóstico adverso significativa na regressão de Cox univariada ($B=0,1623$; $p=0,0007$) (Gráfico 6).

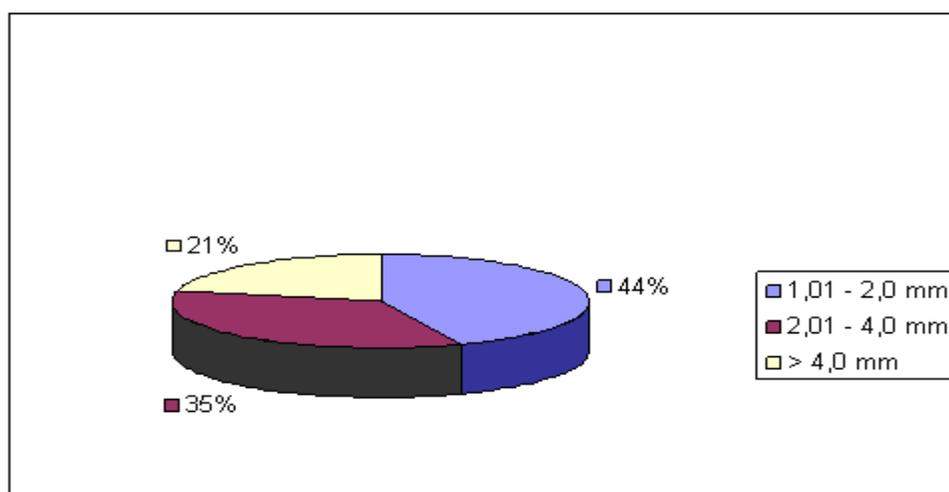


Gráfico 6- Distribuição dos pacientes de acordo com a espessura dos tumores

O nível de Clark variou de 1 a 5 e foi também um fator prognóstico adverso significativo ($B=1,1574$; $p= 0,0011$) (Gráfico 7).

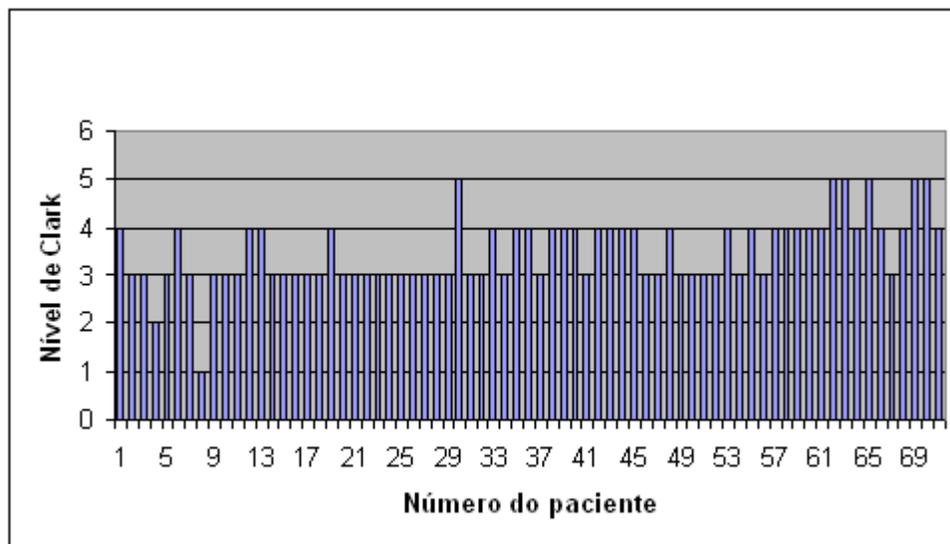


Gráfico 7- Distribuição dos pacientes pelo nível de Clark

No momento do diagnóstico, os pacientes tinham idade média de 55 anos (variação de 14 a 89 anos). A idade não foi um fator prognóstico no modelo de riscos proporcionais ($p > 0,10$) (Gráfico 8).

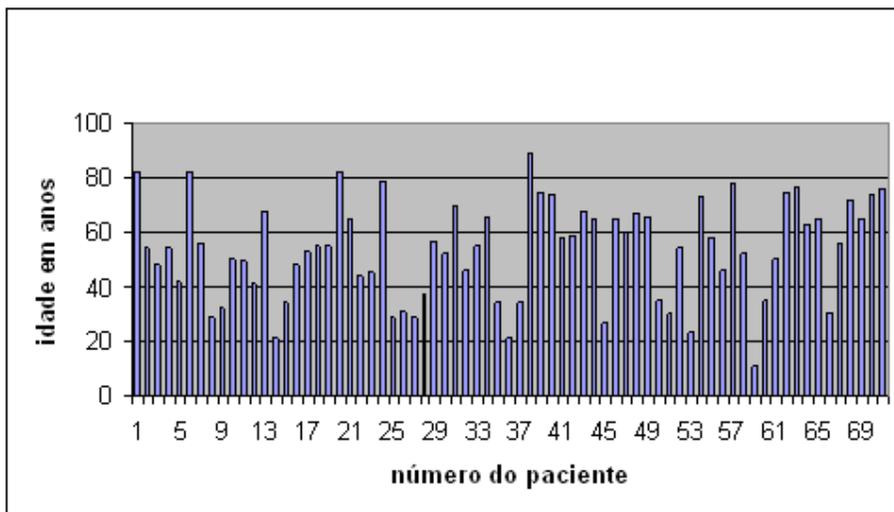


Gráfico 8- Distribuição dos pacientes de acordo com a idade no diagnóstico

Oito pacientes apresentavam linfonodos com metástases e 3 pacientes metástases hematogênicas no diagnóstico, mas estes subgrupos não mostraram piora de sobrevida estatisticamente significativa ($p > 0,1$ em ambos os casos).

A média do índice mitótico foi 3 por 10 campos de grande aumento (variando entre 0 e 52/10HPF).

Este índice mostrou-se estar significativamente correlacionado com a espessura do tumor ($r=0,54$; $p<0,0001$) e revelou ser um fator prognóstico significativo ($B= 0,043$; $p=0,0095$) (Gráfico 9).

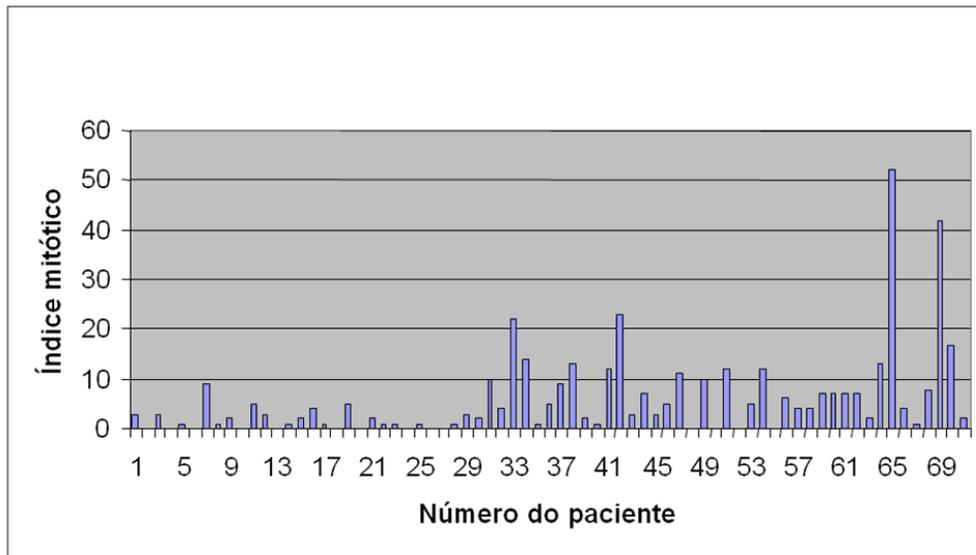


Gráfico 9- Distribuição dos pacientes pelo índice mitótico

A área nuclear teve valor médio de $81,3\mu^2$; (variação de $33,7\mu^2$ a $139,3\mu^2$) e foi também correlacionada com a espessura do tumor ($r=0,405$; $p=0,00045$) e o índice mitótico ($r=0,31$; $p=0,008$) e mostrou ser um fator prognóstico significativamente desfavorável ($B=0,0212$; $p= 0,0274$).

O *form factor* (média: 0,706, variação de 0,573 a 0,807) demonstrou estar correlacionado negativamente com a espessura do tumor ($r=0,431$; $p< 0,0001$) e o índice mitótico ($r=0,28$; $p=0,016$), mas sem relevância prognóstica ($p=0,417$).

A dimensão fractal da estrutura da cromatina (média 2,06, variação 2,01 a 2,082) demonstrou estar significativamente correlacionada com a espessura tumoral ($r=0,482$; $p < 0,001$) e o índice mitótico ($r=0,342$ e $p=0,002$). Também mostrou relevância prognóstica ($B= 73,9$; $p=0,0091$) (Figura 9 e Gráfico 10).

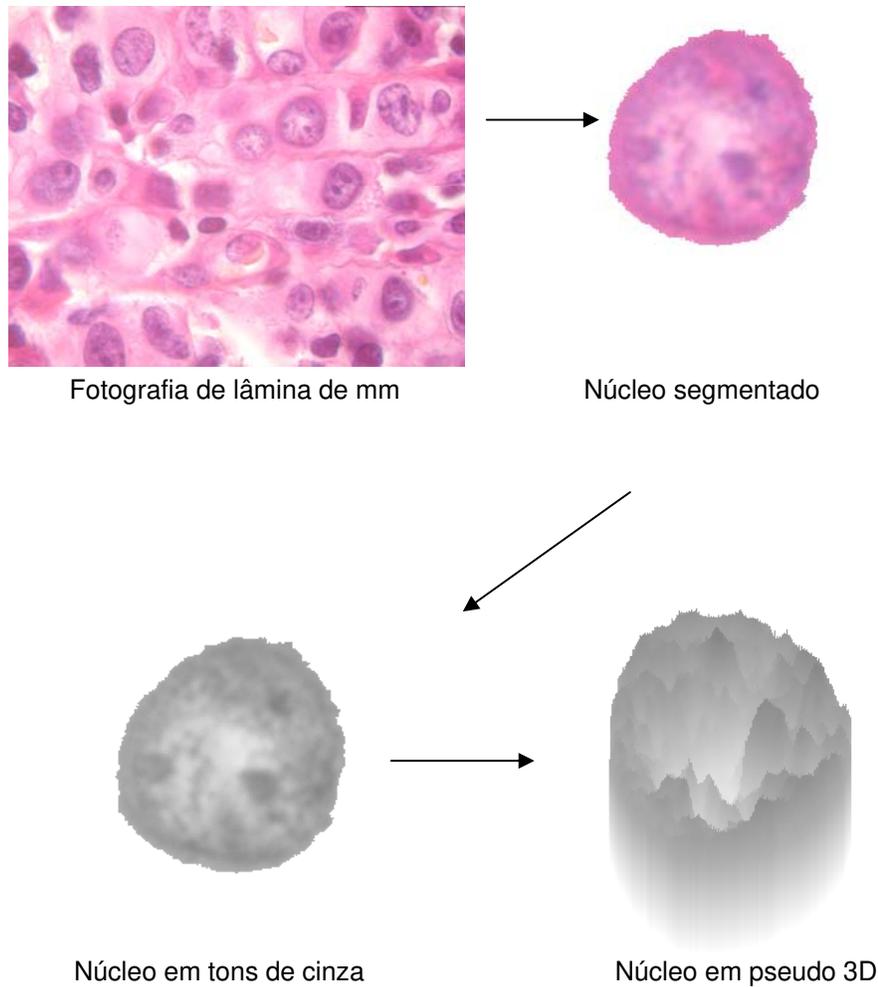


Figura 9- Representação esquemática da obtenção da dimensão fractal

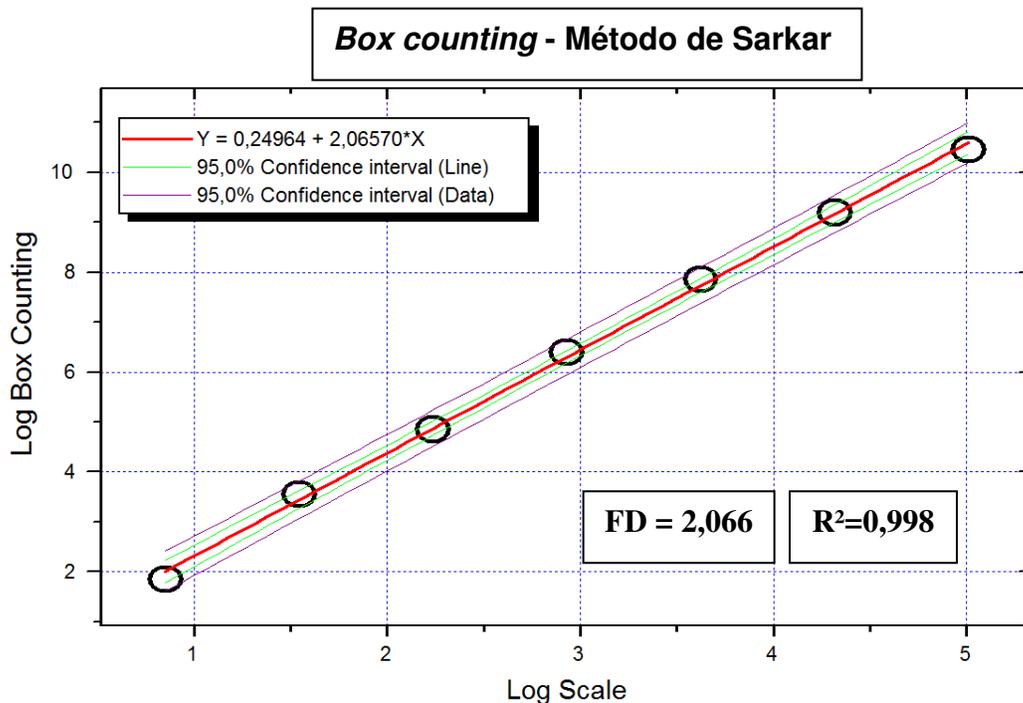


Gráfico 10- Obtenção da dimensão fractal - Y - através do método de Sarkar

Num passo posterior, aplicamos a regressão de Cox multivariada, estratificada pela presença ou ausência de metástases no diagnóstico.

A regressão final incluiu apenas as seguintes variáveis:

Nível de Clark (B=1,0427; p=0,0036) e dimensão fractal da cromatina (B=55,169; p=0,05) como fatores prognósticos independentes.

5- DISCUSSÃO

O comportamento biológico dos tumores está estritamente ligado à sobrevida dos pacientes. Fatores prognósticos usualmente estão baseados em dados clínicos e análise morfológica, incluindo variáveis tais como a espessura do tumor e a taxa de mitose [1,2,3].

Estas variáveis clínico-patológicas, embora sejam marcadores prognósticos robustos e reprodutíveis, não conseguem prever, com precisão, os resultados clínicos para um único paciente.

Por conseguinte, uma busca por novos marcadores é oportuna para que os pacientes com maior risco possam ser identificados e submetidos à intervenção terapêutica precoce ou à orientação mais adequada.

Para se alcançar este objetivo, têm-se utilizado marcadores imunoistoquímicos tradicionais e novos, hibridização genômica comparativa e perfil mutacional [1,4,5]. A maioria destas técnicas são sofisticadas e caras, exigem laboratórios equipados e uma equipe bem treinada.

A citometria digital computadorizada mostrou ser um instrumento que pode ajudar na solução desta problemática.

Fatores conhecidos na literatura, como espessura do tumor, nível de Clark e índice mitótico foram confirmados pelo nosso estudo.

A relevância, em termos de prognóstico, da espessura do tumor, medida que se correlaciona diretamente com a profundidade de infiltração, é hoje considerada o fator prognóstico isolado mais importante nos pacientes com melanoma localizado [111].

Os níveis de Clark obtêm-se pela comparação do nível de invasão tumoral com as camadas da pele.

Os tumores são divididos em 5 níveis.

Nível I: as células tumorais estão confinadas à epiderme (*in situ*);

Nível II: o tumor invade a derme papilar, atravessando a membrana basal;

Nível III: o tumor preenche a derme papilar e estende-se entre a derme papilar e reticular;

Nível IV: o tumor invade a derme reticular;

Nível V: o tumor invade o tecido subcutâneo [110].

O índice mitótico tem sido avaliado como um importante fator prognóstico nos paciente com melanoma [111,112,113,114].

No entanto, a presença de gânglio linfático metastático ou metástases hematogênicas, considerados na literatura [1,2] como fatores prognósticos importantes, não tiveram, no nosso estudo, importância significativa, mas isto se deveu, possivelmente, ao número muito pequeno de pacientes com tumores nos estágios III ou IV.

O poder estatístico da nossa amostra não foi suficiente para que esse dado pudesse alcançar significância estatística.

A fim de eliminar qualquer influência das metástases, no modelo de risco proporcional, utilizamos a regressão de Cox estratificada pela presença ou ausência de metástases.

Durante a progressão do tumor, passando da fase de crescimento radial para a fase de crescimento vertical e, finalmente, para o fenótipo metastático, muitas alterações da expressão gênica podem ser encontradas.

Do ponto de vista clínico vemos alterações de forma, do tamanho, da superfície, mudanças de cor e sintomatologia associada a esta evolução. O maior sinal clínico é a variação da cor da lesão, seguido da mudança de tamanho. Outros sinais como a ulceração, hemorragia e aumento de diâmetro da lesão frequentemente sugerem estágio avançado de melanoma maligno [1].

Do ponto de vista histológico, durante a progressão do câncer, mutações genéticas interagem com a remodelação da cromatina. Os princípios básicos da regulação do ciclo celular estão na iniciação de reações em cascata que irão culminar na fosforilação e desfosforilação de proteínas relevantes. Alterações na expressão ou atividade das proteínas que regulam o ciclo celular e a morte celular programada são essenciais para o aparecimento das neoplasias e sua capacidade de metastatização [12, 13]. Carlson et al, 2009, relataram dificuldades para diferenciar entre melanoma e nevo benigno quando se aplicaram apenas técnicas simples de histologia. Os autores sugerem o uso de novas tecnologias moleculares e de bioinformática, necessárias para predizer com mais certeza o comportamento do tumor e selecionar a terapia mais adequada individualmente [116]. Em outro estudo foram feitas medições objetivas de regiões organizadoras de nucléolos (AgNORs), para diferenciar lesões melanocíticas benignas e malignas [117],

A atividade proliferativa através do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e do anticorpo monoclonal Ki-67 em lesões melanocíticas na pele foi estudada em 1993 [118]. Encontramos ainda um estudo da microdensitometria de DNA nuclear e de variáveis cariométricas, como compactação da cromatina nuclear ou o tamanho e forma do núcleo, para diferenciar entre melanoma e várias formas de nevos melanocíticos [119].

As diferenças cariométricas entre lesões melanocíticas benignas e malignas refletem as alterações no nível genético e epigenético que ocorrem durante a transformação de nevo melanocítico comum em nevo displásico e deste para melanoma [120].

Este processo envolve alterações dinâmicas no genoma, produzidas por mutações com ganho de função de oncogenes ou perda de função de genes supressores tumorais [121]. A perda de expressão da proteína p16 em melanomas está associada à capacidade de invasão e metastização, além de recorrência do tumor e pior prognóstico [6]. A expressão aumentada de ciclina D1 pode resultar de amplificação gênica ou ativação de via acessória através da mutação do gene codificador da proteína *ras* [122]. O gene p53 é um gene com capacidade supressora de tumor, localizado no cromossomo 17p13, cuja mutação é descrita em diversos tumores malignos [8]. Ele possui função primária de manutenção das células em estado de repouso após qualquer dano no DNA, preservando a estabilidade do genoma da célula. A presença de dano no material genético celular induz a expressão da proteína p53, que irá intensificar a expressão do gene *Cip1*, que codifica a proteína p21. Esta proteína leva à parada do ciclo celular na fase G1, através da sua ligação com o complexo CDK-ciclina [123]. A proteína p53 é capaz de induzir apoptose se não houver a devida reparação do DNA danificado, protegendo a célula do acúmulo de mutações e subsequente transformação maligna [124]. Foi descrita, ainda, a participação de p53 na senescência tardia, dependente de encurtamento de telomerase, em melanócitos com deficiência da proteína p16 [125].

O gene *waf1/Cip1* localizado no cromossomo 6p21.2 é também um gene supressor de tumor e codifica a proteína p21, sendo um dos principais genes efetores que participam do controle do ciclo celular através da via do p53. A proteína p21 é um inibidor de quinases dependentes de ciclina (CDKs) e impede a replicação do DNA, ligando-se ao complexo CDK-ciclina e evitando a sua ação sobre a proteína Rb [7]. Outra via de ação da proteína p21 é através de sua ligação direta ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), anulando a atividade da enzima DNA polimerase [126]. Estudos revelam uma correlação positiva entre o nível de expressão da proteína 21 e o avanço do estadió da doença [127].

Assim, podemos esperar que as mudanças de forma e tamanho nuclear e, especialmente, a distribuição da cromatina, poderiam ocorrer em paralelo com a progressão tumoral nos casos de melanoma. Nossas medições cariométricas estão em conformidade com esta hipótese; com o aumento da espessura do tumor, ou seja, com o crescimento vertical, a área nuclear aumenta e o *form factor* diminui, o que significa que as células perdem a sua forma arredondada.

Na regressão univariada de Cox, a área nuclear também foi um fator prognóstico desfavorável importante, ou seja, a capacidade de metastatização foi maior nos melanomas com núcleos maiores.

Este resultado confirma um estudo anterior feito por Mossbacher et al [128], em 1996, que demonstrou que o volume médio nuclear de melanomas primários com curso metastático subsequente foi maior que o volume nuclear dos tumores sem metastatização.

Segundo Talve et al [129], em melanomas aneuplóides, a espessura do tumor está correlacionada com o tamanho nuclear, que, por sua vez, está correlacionado com uma maior proporção de células aneuplóides e aumento da instabilidade genética.

Em nosso trabalho, o tamanho nuclear mostrou-se positivamente correlacionado com a dimensão fractal da arquitetura da cromatina dos núcleos.

A fractalidade de núcleos de tumor em lâminas de citologia ou de histologia demonstrou ser de relevância prognóstica importante em várias neoplasias. Goutzanis et al, 2008, [130], estudaram a dimensão fractal dos núcleos como fator prognóstico no carcinoma epidermóide oral e concluíram que a dimensão fractal estava significativamente correlacionada com o tamanho nuclear, e que tumores bem diferenciados apresentavam valores de FD menores do que os pouco diferenciados.

Delides et al, 2005, [131], num estudo feito com carcinoma de laringe, demonstrou que, aqueles cujas células tinham dimensão fractal menor do que a média da amostra, apresentavam maior sobrevida, concluindo que a FD pode ser utilizada como fator prognóstico nesta doença.

Mashiah et al, 2008, [132], publicaram trabalho em que estudaram linfomas e leucemias aplicando a dimensão fractal em núcleos de células de biópsia da medula óssea. Incluíram no estudo células linfóides de cinco grupos diagnósticos distintos, e células de pacientes com leucemia. Eles propuseram que a dimensão fractal dos núcleos das células hematológicas corresponderiam a sua entidade clínica. Como houve diferença significativa nas dimensões fractais entre os vários tipos de malignidades hematológicas, os autores propuseram que a FD poderia ser uma ferramenta potencialmente útil para a avaliação do comportamento clínico das doenças hematológicas.

Adam et al, 2006, [133], estudaram a dimensão fractal da cromatina nuclear como fator prognóstico nas leucemias linfoblásticas do tipo B. Utilizaram o método de Minkowski-Bouligand e o “*goodness-of-fit*” da FD foi estimado pelos valores de R^2 nos “*plots*” do tipo log-log. Os autores concluíram que, apesar da FD não apresentar relevância prognóstica, pacientes que mostraram valores de R^2 mais elevado tiveram maior sobrevida. Este fato indica que blastos que têm valores mais baixos de R^2 , equivalentes a um padrão de cromatina mais rugoso, o que pode refletir mudanças profundas de metilação do DNA, são indicativos de pior prognóstico.

Metze et al, 2009, em trabalho feito com pacientes com mieloma múltiplo, fizeram ver que as características fractais da cromatina nuclear, nas lâminas de citologia coradas de forma rotineira, são fatores prognósticos independentes [138].

Em nossa investigação, a dimensão fractal da cromatina, obtida em lâminas coradas com hematoxilina, mostrou ser um fator adverso prognóstico independente para sobrevida em melanomas malignos.

Como possível explicação, gostaríamos de associar a fisiopatologia da cromatina nuclear e a morfologia da seguinte maneira: em geral, um comportamento mais agressivo, encontrado em neoplasias geneticamente instáveis, com um maior número de alterações genéticas ou epigenéticas, é representada por um rearranjo mais complexo da cromatina.

Consequentemente, a dimensão fractal nuclear aumentada, encontrada em melanomas mais agressivos, é o equivalente matemático de uma arquitetura de cromatina com maior complexidade.

No nosso estudo, a espessura do tumor, o tamanho nuclear, o índice mitótico e a dimensão fractal mostraram-se positivamente correlacionados.

Não obstante, o procedimento *stepwise* da regressão multivariada de Cox selecionou apenas a dimensão fractal e o nível de Clark como variáveis independentes, que construiu o melhor modelo de risco proporcional, explicando a sobrevivência dos pacientes. Isso significa que a complexidade da distribuição da cromatina contém informação prognóstica relevante, que é independente do nível de Clark.

Esta investigação baseou-se em um número relativamente pequeno de pacientes e, especialmente, de eventos, portanto, o poder estatístico deste estudo ficou limitado, e deve ser seguido por novos trabalhos para sua confirmação.

Em outras palavras, com um número maior de pacientes e eventos, talvez tivéssemos alcançado a entrada de outros fatores na regressão final.

No entanto, gostaríamos de concluir que há fortes indícios de que a dimensão fractal da textura da cromatina nuclear pode ser uma nova e promissora variável em modelos de prognóstico do melanoma maligno.

6- CONCLUSÃO

A literatura consagrou alguns fatores prognósticos para o melanoma maligno, como tipo histológico, medidas de espessura, índice mitótico e nível de Clark. Existem, porém, alterações sutis da cromatina de núcleos, muito além da percepção do olho humano, que podem também servir como fatores prognósticos.

Comparamos esses fatores prognósticos conhecidos com os resultados de análises da dimensão fractal da cromatina, através de programas computacionais, e observamos que o nível de Clark e a dimensão fractal da cromatina, nos melanomas extensivos superficiais, são fatores prognósticos independentes.

Concluimos que a análise computadorizada das imagens histológicas através da utilização de um programa de computador de fácil utilização pode acrescentar valiosas informações relevantes para o paciente.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Creagan ET. Malignant Melanoma: an emerging and preventable medical catastrophe. Mayo Clin Proc, 72: 570-574, 1997.
- 2- de Sa BC, Rezza GG, Scramin AP, Landaman G, Neves RI. Cutaneous melanoma in childhood and adolescence: retrospective study of 32 patients. Melanoma Res.2004 Dec; 14 (6):487-92.
- 3- Czarnecki D, Staples M, Mar A, et al. Recurrent melanoma skin cancer in southern Australia. Int J Dermatol 1996;35:410-412.
- 4- Green CL, Khavari PA. Targets for molecular therapy of skin cancer. Semin Cancer Biol 2004; 14:63-9.
- 5- Rizos H, Becker TM, Holland EA. Cell cycle regulation in the melanocyte. In: Thompson JF, Morton DL, Kroon BBR, editors. Textbook of melanoma. London: Martin Dunitz; 2004. p.13-24.
- 6- Slominski A, Wortsman J, Nickoloff B, McClatchey K, Mihm MC, Ross JS. Molecular pathology of malignant melanoma. Am J Clin Pathol 1998; 110:788-94.
- 7- Albino AP, Reed JA, McNutt NS. Molecular biology of cutaneous malignant melanoma. In: De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 1997. p.1935-46.
- 8- Parmiter RH, Nowell PC. Cytogenetics of melanocytic nevi. J Invest Dermatol 1993; 100:2545-85.
- 9- Parmiter RH, Nowell PC. Cytogenetics of melanocytic nevi. J Invest Dermatol 1993; 100:2545-85.
- 10- Su YA, Trent JM. Genetics of cutaneous malignant melanoma. Cancer Control 1995; 2:392-7.

- 11- Robertson G, Coleman A, Lugo TG. A malignant melanoma tumor suppressor on human chromosome 11. *Cancer Res* 1996; 56:4487-92.
- 12- Kim CJ, Reintgen DS, Yeatman TJ. The promise of microarray technology in melanoma care. *Cancer Control* 2002; 9:49-53.
- 13- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
- 14- Perdinario C. Dermatopathologic variants of malignant melanoma. *Mayo Clin Proc*, 72: 273-279, 1997.
- 15- Duprat JP, Silva DC, Coimbra FJ, Lima IA, Lima EN, Almeida OM, Brechtbuhl ER, Landman G, Scramin AP, Neves RI. Sentinel lymph node in cutaneous melanoma: analysis of 240 consecutive cases. *Plasti reconstr surg.* 2005 Jun; 115(7) 1944-51.
- 16- Lorand-Metze I, Meira DG, Lima CSP, Vassallo J, Metze K. The differential diagnosis between aplastic anemia and hypocellular myelodysplasia in patients with pancytopenia. *Journal of Hematology*: 84:562-563 (1999).
- 17- Metze K, Lobo AN, Lorand-Metze I. Nucleolus organizer regions (agnors) and total tumor mass are independent prognostic parameters for treatment-free period in chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer Pred Oncol*: 89, 4410-443 (2000).
- 18- Jahoda CAB, Reynolds AJ, Chaponnier C, Forester JC, Gabbiani G. Smooth muscle alpha-actin is a marker for hair follicle dermis in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 1991;99:627-36.
- 19- Hall PA, Levison DA. Assessment of cell proliferation in histological material (Review). *J Clin Pathol* 1990; 43:184-92.
- 20- Weinstein GD, Frost P. Cell proliferation in human basal cell carcinoma. *Cancer Res* 1970;30:727-8.

- 21- Grimwood RE, Ferris CF, Mercill DB, Huff JC. Proliferating cells of human basal cell carcinoma are located on the periphery of tumor nodules. *J Invest Dermatol* 1986;86:191-4.
- 22- Sampaio-Goes FC, Oliveira DT, Dorta RG, Nonogaki S, Landman G, Nishimoto IN, Kowalski LP. Expression of PCNA, p53, Bax, and Bcl-X in oral poorly differentiated and basaloid squamous cell carcinoma: Relationship with prognosis. *Head Neck*, 2005.Aug 31.
- 23- Gonzales RC, Wintz P. *Digital Image Processing*. 1987-2nd ed. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts.
- 24- Canzonieri V, Monfardini S, Carbone A. Defining prognostic factors in malignancies through image analysis. *American Journal of Clinical Pathology*. 1995. 103: 195-8.
- 25- Haralick RM, Shanmugan K, Dinstein I. Texture features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 3: 610-21, 1973.
- 26- Morris JA. Information and observer disagreement in histopathology *Histopathology*. 1994. 25:123-8.
- 27- Stephenson TJ. Image analysis. *Journal of Pathology*. 1992. 166(1) 83-7.
- 28- Gerger A, Pompl R, Smolle J. Automated epiluminescence microscopy - tissue counter analysis using CART and 1-NN in the diagnosis of melanoma. *Skin research and technology* 9 (2): 105-110 May 2003.
- 29- Li LXL, Crotty KA, Scolyer RA, Thompson JF, Kril JJ, Palmer AA, McCarthy SW. Use of multiple cytometric markers improves discrimination between benign and malignant melanocytic lesions: a study of DNA microdensitometry, karyometry, argyrophilic staining of nucleolar organizer regions and MIB1-Ki67 Immunoreactivity. *Melanoma research* 13 (6): 581-586 Dec 2003.

- 30- Smolle J, Gerger A, Weger W, Kutzner H, Tronnier M .Tissue counter analysis of histologic sections of melanoma: Influence of mask size and shape, feature selection, statistical methods and tissue preparation. *Analytical cellular pathology* 24 (2-3): 59-67 2002.
- 31- Kahofer P, Hofmann-Wellenhof R, Smolle J, Gerger A .Tissue counter analysis of tissue components in skin biopsies - Evaluation using CART (Classification and regression trees). *American journal of dermatopathology*. 25 (3): 215-222 JUN 2003.
- 32- Kahofer P, Hofmann-Wellenhof R, Smolle J. Tissue counter analysis of dermatoscopic images of melanocytic skin tumours: preliminary findings. *Melanoma research* 12 (1): 71-75 Feb 2002.
- 33- Mijovic Z, Mihailovic D. Discriminant analysis of image karyometric variables in benign and malignant melanocytic skin lesion. *Analytical and quantitative cytology and histology* 24 (6): 314-316 Dec 2002.
- 34- Ahammer H, Devaney TTJ, Tritthart HA. Fractal dimension of K1735 mouse melanoma clones and spheroid invasion in vitro. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 30 (7): 494-499 DEC 2001.
- 35- Oka H, Tanaka M, Kobayashi S, Argenziano G, Soyer HP, Nishikawa T. Linear discriminant analysis of dermoscopic parameters for the differentiation of early melanomas from Clark naevi. *Melanoma research* 14 (2): 131-134 Apr 2004.
- 36- Rubegni P, Ferrari A, Cevenini G, Piccolo D, Burrioni M, Perotti R, Peris K, Taddeucci P, Biagioli M, Dell'Eva G, Chimenti S, Andreassi L. Differentiation between pigmented Spitz naevus and melanoma by digital dermoscopy and stepwise logistic discriminant analysis. *Melanoma research* 11 (1): 37-44 Feb 2001.
- 37- Gerger A, Bergthaler P, Smolle J .An automated method for the quantification and fractal analysis of immunostaining. *Cellular oncology* 26 (3): 125-134 2004.

- 38- Uhoda I, Pierard GE, Pierard- Franchimont C, Arrese JE, Goffin V, Nikkels A, Paquet P, Quatresooz P. Vascularity and fractal dimension of the dermo-epidermal interface in guttate and plaque-type psoriasis. *Dermatology* 210 (3): 189-193 2005.
- 39- Pereira FB, Burnier MN, Shibata H, Wang B, Carey C. Cytomorphometric parameters and the metastatic potential of cutaneous and uveal melanoma - A comparison with prognostic factors. *American journal of dermatopathology* 23 (4): 304-307 Aug 2001.
- 40- True LD. Morphometric applications in anatomic pathology. *Human Pathology*. 1996. 27 (5)450-67.
- 41- Cremer T, Albiez H, Bolzer A, Kohler D, Kupper K, Stefan M et al. From chromosome territories to a functional nuclear architecture. *Cellular Oncology* 27: 105-6, 2005.
- 42- Gilbert N. Chromatin architecture of the human genome. *Cellular Oncology* 27: 106-7, 2005.
- 43- Misteli T. Fundamental principles of nuclear architecture in cancer. *Cellular Oncology* 27: 107, 2005.
- 44- Orr JA, Maxwell P, Diamond J, Hamilton P. W. Histone acetylation induces chromatin reorganization and altered gene expression in prostate neoplasia. *Cellular Oncology* 27: 107-8, 2005.
- 45- Deshabhoina SV, Umbaugh SE, Stoecker WV, Moss RH, Srinivasan SK. Melanoma and seborrheic keratosis differentiation using texture features. *Skin Research and Technology*. 9 (4): 348-356 NOV 2003.
- 46- Anantha M, Moss RH, Stoecker WV. Detection of pigment network in dermatoscopy images using texture analysis. *Computerized medical imaging and graphics* 28 (5): 225-234 jul 2004.

- 47-. Bedin V. Parâmetros de textura de cromatina como fator prognóstico em carcinoma basocelular. Campinas, 2004. Dissertação-Mestrado-Universidade Estadual de Campinas.
- 48- Adam RL. Análise espectral usando a Transformada de Fourier Discreta para o estudo de núcleos celulares: Elaboração de Programa e aplicação no desenvolvimento do coração. Dissertação-Mestrado-Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- 49- Auada MP, Adam RL, Leite NJ, Puzzi MB, Cintra ML, Rizzo WB, Metze K. Texture analysis of the epidermis based on fast Fourier transformation in Sjögren-Larsson syndrome. *Anal Quant Cytol Histol.* 2006 Aug;28(4):219-27.
- 50- Chapman JA, Miller NA, Lickley HL, Qian J, Christens-Barry WA, Fu Y, Yuan Y, Axelrod DE. Ductal carcinoma in situ of the breast (DCIS) with heterogeneity of nuclear grade: prognostic effects of quantitative nuclear assessment. *BMC Cancer.* 2007 Sep 10;7:174.
- 51- de Troya-Martín M, Blázquez-Sánchez N, Fernández-Canedo I, Frieyro-EliceGUI M, Fúnez-Liébana R, Rivas-Ruiz F. Dermoscopic study of cutaneous malignant melanoma: descriptive analysis of 45 cases *Actas Dermosifiliogr.* 2008 Jan-Feb;99(1):44-53.
- 52- Diaz G, Zucca A, Setzu MD, Cappai C. Chromatin pattern by variogram analysis. *Microsc Res Tech.* 1997 Nov 1;39(3):305-11.
- 53- Doudkine A, Macaulay C, Poulin N, Palcic B. Nuclear texture measurements in image cytometry. *Pathologica* 87: 286-99, 1995.
- 54- Guillaud M, Adler-Storthz K, Malpica A, Staerkel G, Maticic J, Van Niekirk D, Cox D, Poulin N, Follen M, Macaulay C. Subvisual chromatin changes in cervical epithelium measured by texture image analysis and correlated with HPV. *Gynecol Oncol.* 2005 Dec;99(3 Suppl 1):S16-23. Epub 2005 Sep.

- 55- Huisman A, Ploeger LS, Dullens HF, Poulin N, Grizzle WE, Van Diest PJ. Development of 3D chromatin texture analysis using confocal laser scanning microscopy. *Cell Oncol.* 2005;27(5-6):335-45.
- 56- Huisman A, Ploeger LS, Dullens HF, Jonges TN, Belien JA, Meijer GA, Poulin N, Grizzle WE, Van Diest PJ. Prostate tissue using chromatin texture analysis in 3-D by confocal laser scanning microscopy. *Prostate.* 2007 Feb 15;67(3):248-54.
- 57- Isitor GN, Thorne R. Comparison between nuclear chromatin patterns of digitalized images of cells of the mammalian testicular and renal tissues: an imaging segmentation study. *Comput Med Imaging Graph.* 2007 Mar; 31(2):63-70. Epub 2006 Dec 1.
- 58- Karaçali B, Tözeren A. Automated detection of regions of interest for tissue microarray experiments: an image texture analysis. *BMC Med Imaging.* 2007 Mar 9;7:2.
- 59- Makarov DV, Marlow C, Epstein JI, Miller MC, Landis P, Partin AW, Carter HB, Veltri RW. Using nuclear morphometry to predict the need for treatment among men with low grade, low stage prostate cancer enrolled in a program of expectant management with curative intent. *Prostate.* 2008 Feb 1;68(2):183-9.
- 60- Mello MR, Metze K, Adam RL, Pereira FG, Magalhães MG, Machado CG, Lorand-Metze I. Phenotypic subtypes of acute lymphoblastic leukemia associated with different nuclear chromatin texture. *Anal Quant Cytol Histol.* 2008 Apr;30(2):92-8.
- 61- Rode M, Flezar MS, Kogoj-Rode M, Krasovec M. Image cytometric evaluation of nuclear texture features and DNA content of the reticular form of oral lichen planus. *Anal Quant Cytol Histol.* 2006 Oct;28(5):262-8.

- 62- Sabo E, Beck AH, Montgomery EA, Bhattacharya B, Meitner P, Wang JY, Resnick MB. Computerized morphometry as an aid in determining the grade of dysplasia and progression to adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Lab Invest*. 2006 Dec;86(12):1261-71. Epub 2006 Oct 30.
- 63- Scarpelli M, Montironi R, Tarquini LM, Hamilton PW, López Beltran A, Ranger-Moore J, Bartels PH. Karyometry detects subvisual differences in chromatin organisation state between non-recurrent and recurrent papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. *J Clin Pathol*. 2004 Nov;57(11):1201-7.
- 64- Scheurer ME, Guillaud M, Tortolero-Luna G, Mcaulay C, Follen M, Adler-Storthz K. Human papillomavirus-related cellular changes measured by cytometric analysis of DNA ploidy and chromatin texture. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007 Sep;72(5):324-31.
- 65- Schmid K, Angerstein N, Geleff S, Gschwendtner A. Quantitative nuclear texture features analysis confirms WHO classification 2004 for lung carcinomas. *Mod Pathol*. 2006 Mar;19(3):453-9.
- 66- Christopher MM, Hotz CS. Cytologic diagnosis: expression of probability by pathologists. *Vet Clin Pathol*. 2004;33(2):84-95.
- 67- Metze K, Adam RL. Quantification in histopathology - some pitfalls. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38:141-3, 2005.
- 68- Adam RL, Ribeiro E, Metze K, Leite NJ, Lorand-Metze I. Morphometric and granulometric features of erythroblasts as a diagnostic tool of hematologic diseases. *Cytometry* 59 (1):46, 2004.
- 69- Adam RL, Leite NJ, Carvalho RB, Silva PV, Metze K. Granulometric Residues as a diagnostic tool in cytology. *Cytometry* 59 (1):63, 2004.
- 70- Metze K, Adam RL, Silva PV, Carvalho RB, Leite NJ. Analysis of chromatin texture by pinkus' approximate entropy. *Cytometry* 59(1):63, 2004.

- 71- Metze K, Bedin V, Adam RL, Cintra ML, Souza EM, Leite NJ. Parameters derived from the Fast Fourier Transform are predictive for the recurrence of basal cell carcinoma. *Cellular Oncology* 27:137, 2005.
- 72- Metze K, Piazza AC, Iaza AA, Adam RL, Leite NJ. Texture analysis of AgNOR stained nuclei in lung cancer. *Cellular Oncology* 27:137-8, 2005b.
- 73- Metze K, Ferreira RC, Adam RL, Leite NJ, Ward LS, De Matos PS. Chromatin Texture is Size Dependent in Follicular Adenomas But Not in Hyperplastic Nodules of the Thyroid. *World J Surg.* 2008 Sep 12.
- 74- Wanderley de Souza Filho, tese de mestrado-UNICAMP 1999.
- 75- Adam RL, Leite NJ, Metze K. Spectral analysis using discrete Fourier Transformation for the study of nuclei: software design and application on cardiomyocytes during physiological development. *Analytical Cellular Pathology* 22: 64 – 5, 2001.
- 76- Banda-Ganboa H. et al. Spectral Analysis of Cervical Cells using the discrete Fourier Transform. *Anal Cell Pathol* 5 (1993) 85-102.
- 77- Smith et al. Similarity measurement method for the classification of architecturally different images. *Comp Biomed Res* 32 (1999) 1-12.
- 78- Vries HJCD, Enomoto DHN, Mrle JV, Zuijlen PPMV, Mekkes JR, Bos JD. Dermal organization in scleroderma. The FFT and the laser scatter method objectify fibrosis in nonlesional as well as lesional skin. *Laboratory Investigation*.80:1281-9 2000.
- 79- Clark JI. Fourier and Power law analysis of structural complexity in cornea and lens. *Micron* 32(3) 239-249 2001.
- 80- Metze K, Gomes Neto A, Adam RL, Gomes AA, Leite NJ, Souza EM, Cintra ML. Texture of dermal elastotic tissue in patients with different phototypes. *Analytical Cellular Pathology* 24: 196, 2002.

- 81- Metze K, Silva PVVT, Adam RL, Cintra ML, Leite NJ. Differentiation of keloid and hypertrophic scar by texture analysis. *Analytical Cellular Pathology* 24: 196-7, 2002.
- 82- Adam RL, Corsini TCG, Silva PV, Cintra ML, Leite NJ, Metze K. Fractal dimensions applied to thick contour detection and residues - comparison of keloids and hypertrophic scars. *Cytometry* 59 (1): 63-4 2004.
- 83- Metze K, Silva RC, Adam RL, Leite NJ, Pereira FG, Lorand-Metze I. Relation between chromatin texture and phenotype in acute leukemias. *Cellular Oncology* 27: 112-3, 2005.
- 84- Adam RL, Leite NJ, Metze K. Image preprocessing improves Fourier-based texture analysis of nuclear chromatin. *Anal Quant Cytol Histol.* 2008 Jun;30(3):175-84.
- 85- Metze K, Adam RL, Vidop JR, Lorand-Metze IG. The Influence of Staining Characteristics on Nuclear Texture Features in Cytology. *Anal Quant Cytol Histol.* 2009 Aug 31(4); 241-6.
- 86- Metze K. Dichotomization of continuous data--a pitfall in prognostic factor studies. *Pathol Res Pract.* 2008;204(3):213-4. Epub 2008 Jan 22.
- 87- Dubuc B, Quiniou J F, Roques-Carmes C, Tricot C, Zucker S W. Evaluating the fractal dimension of profiles. *Physical Review A* 1989; 39:1500-1513.
- 88- Mandelbrot BB. Stochastic models for the Earth's relief, the shape and the fractal dimension of the coastlines, and the number-area rule for islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Oct;72(10):3825-3828.
- 89- Theocharakis P, Glotsos D, Kalatzis I, Kostopoulos S, Georgiadis P, Sifaki K, Tsakouridou K, Malamas M, Delibasis G, Cavouras D, Nikiforidis G. Pattern recognition system for the discrimination of multiple sclerosis from cerebral microangiopathy lesions based on texture analysis of magnetic resonance images. *Magn Reson Imaging.* 2008 Sep 9.

- 90- Landini G. Is periodontal breakdown a fractal process? Simulations using the Weierstrass-Mandelbrot function. *J Periodontal Res.* 1997 Apr;32(3):300-7.
- 91- Dioguardi N, Grizzi F, Bossi P, Roncalli M. Fractal and spectral dimension analysis of liver fibrosis in needle biopsy specimens. *Anal Quant Cytol Histol.* 1999 Jun;21(3):262-6.
- 92- Shapiro NA, Poloz TL, Shkurupij VA, Tarkov MS, Poloz VV, Demin AV. Application of artificial neural network for classification of thyroid follicular tumors. *Anal Quant Cytol Histol.* 2007 Apr;29(2):87-94.
- 93- Goutzanis L, Papadogeorgakis N, Pavlopoulos PM, Katti K, Petsinis V, Plochoras I, Pantelidaki C, Kavantzias N, Patsouris E, Alexandridis C. Nuclear fractal dimension as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2008 Apr;44(4):345-53. Epub 2007 Aug 9.
- 94- Adam RL, Silva RC, Pereira FG, Leite NJ, Lorand-Metze I, Metze K. The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol.* 2006;28(1-2):55-9.
- 95- Dev P. Basic principles and applications of fractal geometry in pathology: a review. *Anal Quant Cytol Histol.* 2005 Oct;27(5):284-90.
- 96- Lee TK, McLean DI, Atkins MS. Irregularity index: a new border irregularity measure for cutaneous melanocytic lesions. *Med Image Anal*;7(1):47-64, 2003.
- 97- Ferreira R C, de Matos OS, Adam RL, Leite NJ, Metze K. Application of the Minkowski-Bouligand fractal dimension for the differential diagnosis of thyroid follicular neoplasias. *Cell Oncol.* 2006;28(5-6):331-3.
- 98- Rocha R B, Adam R L, Leite NJ, Metze K, Rossi MA. Shannon's entropy and fractal dimension provide an objective account of bone tissue organization during calvarial bone regeneration. *Microsc Res Tech.* 2008 Aug; 71(8):619-25.

- 99- Herreros FO, Cintra ML, Adam RL, de Moraes AM, Metze K. Remodeling of the human dermis after application of salicylate silanol. *Arch Dermatol Res*. 2007 Apr;299(1):41-5.
- 100- Sakar et al. An Efficient Approach to Estimate Fractal Dimension of Textural Images. *Pattern Recognition*, Vol. 25, No. 9, pp. 1035-1041, 1992.
- 101- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4:844-7.
- 102- Kielhorn E, Provost E, Olsen D, et al. Tissue microarray-based analysis shows phospho-catenin expression in malignant melanoma is associated with poor outcome. *Int J Cancer* 2003; 103:652-6.
- 103- Sauter ER, Yeo UC, von Steinhilber A, et al. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002; 62:3200-6.
- 104- Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput *in situ* studies. *J Pathol* 2001; 195:72-9.
- 105- Shen SS, Zhang PS, Eton O, Prieto VG. Analysis of protein tyrosine kinase expression in melanocytic lesions by tissue array. *J Cutan Pathol* 2003; 30:539-47.
- 106- Dai DL, Makretsov N, Campos EI, et al. Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4409-14.
- 107- Pacifico MD, Grover R, Richman PI, Daley FM, Buffa F, Wilson GD. Development of a tissue array for primary melanoma with long-term follow-up: discovering melanoma cell adhesion molecule as an important prognostic marker. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115:367-75.

- 108- Balch CM, Soong S-J, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001; 19:3622-34.
- 109- Balch CM, Buzaid AC, Soong S-J, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:3635-48.
- 110- Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:1893-904.
- 111- Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer* 2003; 97:1488-98.
- 112- Busam KJ. The prognostic importance of tumor mitotic rate for patients with primary cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol* 2004;11:360-1. Epub 2004 Mar 15.
- 113- Francken AB, Shaw HM, Thompson JF, et al. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. *Ann Surg Oncol* 2004; 11:426-33.
- 114- Barnhill RL, Katzen J, Spatz A, Fine J, Berwick M. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol* 2005; 32:268-73.
- 115- Nagore E, Oliver V, Botella-Estrada R, Moreno-Picot S, Insa A, Fortea JM. Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitosis. *Melanoma Res* 2005; 15:169-77.

- 116- Carlson JA, Ross JS, Slominski AJ. New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. *Clinics in Dermatology* .2009; 27, 75-102.
- 117- Li LX, Crotty KA, Palmer AA, et al. Argyrophilic staining of nucleolar organizer region count and morphometry in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol*. 2003;25:190-7.
- 118- Rieger E, Hofmann-Wellenhof R, Soyer HP, et al. Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. A quantitative immunohistochemical study. *J Cutan Pathol*. 1993;20: 229-36.
- 119- Li LX, Crotty KA, Palmer AA, et al. Differentiating benign nevi from malignant melanoma using DNA microdensitometry and karyometry and maturation: a zonal comparison, correlation and multivariate analysis. *Anal Quant Cytol Histol*. 2002;24:234-43.
- 120- Rothhammer T and Bosserhoff AK. Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res*. 20; 92-111.
- 121- Neto DS, Pantaleão L, de Sá BC, Landman G. Alpha-v-beta3 integrin expression in melanocytic nevi and cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol*. 2007 ;34(11):851-6.
- 122- Filmus J, Robles AI, Shi W, Wong MJ, Colombo LL, Conti CJ. Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 1994; 9:3627-33.
- 123- Czajkowski R, Drewa T, Wozniak A, Krzyzyska-Malinowska E. Cell cycle in sporadic melanoma. *Int J Dermatol* 2002; 41:550-6.
- 124- Bae I, Smith ML, Sheikh MS, et al. An abnormality in the p53 pathway following gamma-irradiation in many wild-type p53 human melanoma lines. *Cancer Res* 1996; 56:840-7.

- 125- Bury J, Cross S. Molecular biology in diagnostic histopathology: Part I - The cell cycle. *Curr Diag Pathol* 2003; 9:266-75.
- 126- Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Kellokoski JK, et al. p21^{WAF1/CIP1} expression in stage I cutaneous malignant melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival. *Br J Cancer* 1999; 79:895-902.
- 127- Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol* 1998; 20:255-61.
- 128- Mossbacher U, Knollmayer S, Binder M, Steiner A, Wolff K, Pehamberger H. Increased nuclear volume in metastasizing "thick" melanomas. *J Invest Dermatol.* 1996;106(3):437-40.
- 129- Talve LA, Collan YU, Ekfors TO. Primary malignant melanoma of the skin. Relationships of nuclear DNA content, nuclear morphometric variables, Clark level and tumor thickness. *Anal Quant Cytol Histol.* 1997;19(1):62-74.
- 130- Goutzanis L, Papadogeorgakis N, Pavlopoulos PM. Nuclear fractal dimension as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2008; 44 (4); 345-353.
- 131-. Delides A, Panayiotides I, Alegakis A. Fractal dimension as a prognostic factor for laryngeal carcinoma. *Anticancer Research.* 2005; 25 (3B) 2141-2144.
- 132- Mashiah A, Wolach O, Sandbank J. Lymphoma and leukemia cells possess fractal dimensions that correlate with their biological features. *Acta Haematologica.* 2008; (119) 142-150.
- 133- Adam RL, Silva RC, Pereira FG. The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Cellular Oncology.* 2006; 28;55-59.

- 134- Metze K, Ferro DP, Falconi MA, Adam RL, Ortega M, Lima CP, De Souza AC, Lorand-Metze I. Fractal characteristics of nuclear chromatin in routinely stained cytology are independent prognostic factors in patients with multiple myeloma *Virchows Archiv.* 2009; 455.