

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

SISBI/UFU



1000215494

MON
619:616-095.5
U163-m
TES/MEU

MORFOMETRIA DO NÚCLEO DE CÉLULAS
NEOPLÁSICAS COMO MÉTODO DE
DIAGNÓSTICO DE HISTIOCITOMA,
MASTOCITOMA E TUMOR VENÉREO
TRANSMISSÍVEL EM CÃES

Katia Cristina de Andrade Waldemarin

Médica Veterinária

Uberlândia - Minas Gerais - Brasil

2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**MORFOMETRIA DO NÚCLEO DE CÉLULAS
NEOPLÁSICAS COMO MÉTODO DE
DIAGNÓSTICO DE HISTIOCITOMA,
MASTOCITOMA E TUMOR VENÉREO
TRANSMISSÍVEL EM CÃES**

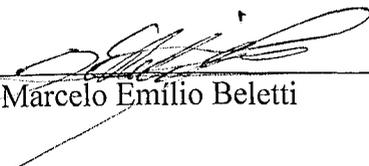
Katia Cristina de Andrade Waldemarin
Médica Veterinária

Uberlândia - Minas Gerais - Brasil

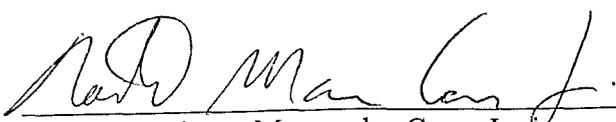
2003

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Clínica e Cirurgia
Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia**

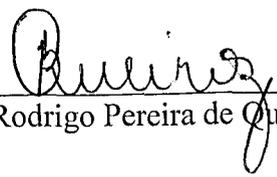
Dissertação defendida e aprovada em 19 de dezembro de 2003, pela comissão examinadora constituída por:



Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti



Prof. Dr. Roberto Marcondes Cesar Junior



Prof. Dr. Rodrigo Pereira de Queiroz



Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

“Dois importantes fatos, nesta vida, saltam aos olhos; primeiro, que cada um de nós sofre inevitavelmente derrotas temporárias, de formas diferentes, nas ocasiões mais diversas. Segundo, que cada adversidade traz consigo a semente de um benefício equivalente. Ainda não encontrei homem algum bem-sucedido na vida que não houvesse antes sofrido derrotas temporárias. Sempre que um homem supera os reveses, torna-se mental e espiritualmente mais forte... É assim que aprendemos o que devemos à grande lição da adversidade”.

(Andrew Carnegie)

À aqueles que se sacrificaram
por mim e que muitas vezes
abriram mão de seus sonhos
para que os meus pudessem
se tornar realidade: meus pais

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

*“ O primeiro impulso de uma alma nobre, no mundo,
é querer consertá-lo de uma só vez,
mas o tempo mostrar-lhe-á o engano,
e ela passará a consertar a si mesma...”*
Sócrates

Á DEUS, Pai de infinita bondade. Senhor do universo, Ser onipotente, onipresente, imutável, eterno, soberanamente justo e bom. DEUS que guia meu espírito, ilumina minha mente e acalenta meu coração a todo o momento. Além de me prover de oportunidades, me deu todas as condições necessárias para a realização de meus sonhos. A Ti agradeço Senhor o dom da vida e todas as preciosidades nela envolvidas.

"Deus será abrigo e sombra contra o calor do dia, e refúgio e esconderijo contra a tempestade e a chuva".

Isaias 4: 6

A meus pais: Norival Waldemarin e Carmen Lúcia de Andrade Waldemarin que sempre estiveram atentos e presentes em minha vida, se tornando preciosos presentes de Deus. Nenhuma conquista teria este sabor, se não fosse acompanhada de amor e incentivos. A vocês que educaram meu espírito me ensinando valores eternos e fundamentais como: lealdade, amizade, responsabilidade, respeito e honestidade, peço a Deus que recompense tanto amor e dedicação.

“Os pais dão aos filhos raízes e asas”

Ao meu irmão: Renato Fabrício de Andrade Waldemarin que sempre foi um exemplo em minha vida...

Ao meu amigo, professor e orientador: Marcelo Emílio Beletti por acreditar em mim, pela paciência com minhas limitações e pelo incentivo constante, que seu caminho seja sempre cheio de luz e paz...

Ao meu co-orientador: Luciano da Fontoura Costa por me receber como orientada e pelos constantes ensinamentos.

Aos meus queridos avós: Clarice Moraes de Andrade e José de Andrade, pelo apoio constante e por me mostrarem que em certas circunstâncias orar por uma pessoa é o melhor, senão tudo o que pode ser

feito por ela. Que Deus os abençoe.

Aos meus queridos: tio Joaquim, tia Maria Isabel, Gabriel e vovó Assumpta, só Deus poderá recompensá-los, vocês são verdadeiros anjos em minha vida...

Ao meu tio André (sempre meu socorro), meus sobrinhos Othon e Giulia e a Flávia Bergantini Waldemarin: risos e brincadeiras também fazem parte das conquistas...

Aos meus amigos, sempre presentes em meu coração e em minha vida: Luciane Furlan, Renata Matsuura, Kátia Rogéria Arantes (há 15 anos com uma fidelidade quase canina...), Marialva Faria (sempre com seus cães), Fernanda Borges Neto, Fátima Antonio, Cleide Aparecida, Patrícia Orlandini, Roberta Torres, Martha De Domenico, Guilherme Nascimento Cunha e Ricardo Jorge Falchetto que inúmeras vezes secaram minhas lágrimas, ouviram minhas lamentações e me incentivaram ao longo desta e de outras caminhadas, muito obrigada.

“Amigos são como oásis colocados por Deus em nossa jornada”

Emmanuel

Aos meus colegas do mestrado: Mariana de Mello, Tânia Berbet, Sirlei Manzam Hortêncio, Jaqueline e Christina Siqueira Mendonça, obrigada pelo companheirismo e ensinamentos.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário, do laboratório de Histologia e ao Marcos Antonio de Oliveira, secretário da pós-graduação pela preciosa ajuda.

Aos sempre amados por mim: os animais. Por involuntariamente doarem suas vidas para meu aprendizado e por todos os ensinamentos a nós transmitidos sobre respeito, fidelidade e amor...

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO DE LITERATURA	03
Histiocitoma	03
Mastocitoma	05
Tumor venéreo transmissível	09
Citomorfometria em patologia	11
III. MATERIAL E MÉTODO	14
Material biológico	14
Captura e processamento de imagens	14
Análise das imagens	16
Análise estatística	23
IV. RESULTADOS	26
V. DISCUSSÃO	32
VI. CONCLUSÃO	36
VII. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	37

LISTA DE ABREVIATURAS

a	área
amR	alongamento médio dos ROIs
apR	alongamento do principal ROI
aR	área média dos ROIs
c	comprimento
dmR	distância média dos centros de massa dos ROIs ao centro de massa do núcleo
doR	desvio padrão da razão de ocupação dos ROIs
dpR	distância do centro de massa do principal ROI ao centro da massa do núcleo
e	elipsidade
HE	Hematoxilina e eosina
l	largura
l/c	largura/comprimento
lc	lacunaridade
moR	média da razão de ocupação dos ROIs
nR	número de ROIs
p	perímetro
paR	primeiro autovalor da matriz de distância
pR	perímetro médio dos ROIs
reR	razão espectral da distância
ROI	“Region of Interest”
saR	segundo autovalor da matriz de distância
TVT	tumor venéreo transmissível
TM3T	análise de todas as medidas para os três tipos de tumores
Tm2T	análise de todas as medidas analisadas e todos os casos de histiocitoma e de TVT
3M3T	análise da área, perímetro e elipsidade para os três tipos de tumores

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Sistema de classificação clínica da Organização Mundial de Saúde (OMS) para os mastocitomas caninos	08
Tabela 2: Média e desvio padrão das medidas usadas nos três tipos de tumores.....	26
Tabela 3: Coeficientes canônicos das funções discriminantes	27
Tabela 4: Estrutura canônica de cada função	27
Tabela 5: Erro estimado na identificação do tipo de tumor utilizando-se as funções canônicas obtidas com as medidas básicas.....	28
Tabela 6: Erro estimado na identificação do tipo de tumor utilizando-se as funções canônicas obtidas com todas as medidas.....	29
Tabela 7: Erro estimado na identificação de TVT e histiocitoma utilizando-se a função discriminante obtida com todas as medidas.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Fotomicrografia do histiocitoma canino em objetiva de 100x	05
Figura 2: Fotomicrografia de mastocitoma canino em objetiva de 100x (A letra E marca um eosinófilo e a letra M marca uma célula neoplásica de mastocitoma)	08
Figura 3: Fotomicrografia de TVT em objetiva de 100x	11
Figura 4: Imagem do núcleo segmentado seguido do núcleo em tons de cinzas.....	15
Figura 5: (a)– Imagem do objeto original, (b) – Imagem do objeto depois da digitalização (forma discreta).....	16
Figura 6: Representação de uma imagem através de uma matriz.....	17
Figura 7: (a) Imagem do objeto original, (b) – Imagem do objeto depois da digitalização (forma discreta), (c) – Contorno da imagem digitalizada.....	17
Figura 8: Imagem original do núcleo antes e após o reposicionamento do núcleo para a verificação da largura e do comprimento do núcleo	18
Figura 9: Representação dos ROIs contidas em uma imagem.....	19
Figura 10: Representação da distância dentre os ROIs e o centro do núcleo.....	20
Figura 11: Esquema representativo de como foi calculada a lacunaridade do núcleo (a caixa $s \times s$ é colocada inicialmente no canto superior esquerdo da imagem, mas, somente os valores encontrados dentro do núcleo são considerados na formação do vetor): 1- primeira posição da “caixa” com 2×2 pixels que será considerada na formação do vetor S; 2- a “caixa” se move 1 pixel à direita; 3- última posição da caixa que participará da formação do vetor S com 2×2 pixels; 4- Reinício com “caixa” 4×4 pixels (a “caixa” aumenta de 2 em 2 pixels); 5- deslocamento da caixa 4×4 pixels para a direita; 6- fase final formação do vetor S com “caixa” 4×4 pixels. Assim o processo se repete até a caixa 20×20 pixels.....	21

- Figura 12: Representação da distância entre os centros dos ROIs e o núcleo da célula e sua respectiva matriz.....22
- Figura 13: Representação da “região de ocupação dos ROIs” posterior a dilatação destes A1 é a área do ROI e A2 é a área da ocupação do ROI23
- Figura 14: Plot das variáveis canônicas de todos os núcleos de histiocitoma, mastocitoma e TVT, considerando-se as medidas básicas.....28
- Figura 15: Plot das variáveis canônicas dos núcleos de histiocitoma, mastocitoma e TVT, considerando-se todas as medidas.....30
- Figura 16: Imagem do gráfico da variância canônica para todos os casos de Histiocitoma e TVT com todas as medidas utilizadas.....31

MORFOMETRIA DO NÚCLEO DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE HISTIOCITOMA, MASTOCITOMA E TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL EM CÃES

RESUMO: Histiocitoma, mastocitoma e tumor venéreo transmissível são tumores freqüentes em cães. É importante o diagnóstico diferencial entre estes tumores, principalmente quando o tumor venéreo transmissível é ectópico. A citometria de imagem pode ser usada como auxiliar no diagnóstico diferencial de patologias semelhantes histologicamente, como nos casos destes tumores. O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfometricamente o núcleo e a cromatina das células neoplásicas destes tumores e avaliar o potencial deste tipo de análise como ferramenta auxiliar no diagnóstico diferencial destas patologias. Foram utilizados 15 cortes histológicos de cada tipo de tumor, sendo analisados 100 núcleos de cada caso. Além das características geométricas básicas (área, perímetro e elipsidade), tradicionalmente utilizadas como auxiliar no diagnóstico histopatológico, também foram utilizadas medidas geométricas mais elaboradas, bem como a caracterização da textura nuclear através de métodos tradicionais, como a lacunaridade e através de novos métodos propostos neste trabalho. Realizou-se análise de variância e de discriminantes canônicas para a avaliação estatística. A morfometria utilizando medidas básicas mostrou-se ineficiente para diferenciar estes tumores. Com o uso das demais medidas otimizadas pela análise de discriminante canônica, esta metodologia revelou-se uma excelente ferramenta eficiente para o diagnóstico diferencial de histiocitoma e tumor venéreo transmissível. Para o diagnóstico diferencial dos três tipos de tumores esta metodologia deve ser usada somente como ferramenta auxiliar.

Palavras – chave: cães, histiocitoma, mastocitoma, tumor venéreo transmissível canino, análise de imagem.

MORPHOMETRY NUCLEAR OF NEOPLASTIC CELLS AS METHOD OF DIAGNOSTIC OF HISTIOCYTOMA, MASTOCYTOMA AND TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR IN DOGS

SUMMARY: Histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumors are frequent in dogs. The differential diagnostic between these tumors is important, mainly when the transmissible venereal tumor is ectopic. Image cytometry can be used as an auxiliary tool in the differential diagnostic of the histological similar pathology, such as these tumors. The objective of this work was to characterize the nucleus and the chromatin morphometry of the neoplastic cells of these tumor types and to evaluate the potential of this methodology as differential diagnostic of these pathologies. Fifteen histological slides of each type of the tumor were used and one hundred nucleus of each case were analyzed. Geometric basic characteristics (area, perimeter and ellipticity) traditionally used as auxiliary tools in the histopathological diagnostic, as well as more elaborated geometric measures and the characterization of the nuclear texture through of lacunarity and others methods considered in this work were used. Variance and canonical discriminant analysis were made for statistic evaluation. The morphometry using basic measurements was inefficient to identify correctly these tumor types. However, this methodology showed to be a good tool for differential diagnosis of the histiocytoma and transmissible venereal tumor. This methodology should be used only as an auxiliary tool for the differential diagnostic of the three considered tumor types

Keywords: dogs, histiocytoma, mastocytoma, transmissible venereal tumor, image analysis.

I. INTRODUÇÃO

Hoje em dia os cães freqüentemente são considerados como membros da família, tornando essencial um rápido e eficiente mecanismo de diagnóstico, terapêutica e prognóstico nos casos de tumores nestes animais. Tumores em pele e tecido subcutâneo são os tumores que mais freqüentemente afetam cães, sendo cerca de um terço de todos os tumores nesta espécie (MARTIN DE LAS MULAS *et al.* 1999). Dentre os vários tipos de tumores, destacam-se pela alta incidência o histiocitoma, o mastocitoma e o tumor venéreo transmissível (TVT).

Histiocitoma é um tumor benigno que acomete cães jovens sendo que 50% dos casos ocorrem em animais com menos de dois anos de idade, podendo ocasionalmente ocorrer em animais mais velhos (CALDERWOOD MAYS & BERGERON, 1986; BENDER & MULLER, 1989; QUEIROZ, 1996; MARTIN DE LAS MULAS *et al.* 1999; MORRIS *et al.* 2000; NAGATA *et al.* 2000; MULLER *et al.* 2001). Sua origem é histiocítica, sendo necessário o diagnóstico diferencial para inflamação focal granulomatosa, TVT, linfossarcoma cutâneo e mastocitoma (CONROY, 1983; QUEIROZ, 1996).

Os mastocitomas são neoplasias comuns do cão originadas dos mastócitos. Compõe aproximadamente 7 a 20% das neoplasias cutâneas malignas nesta espécie e tem sua causa ainda desconhecida (ROGERS, 1996; GRAHAN & O'KEEFE, 1998; STREFEZZI, XAVIER, CATÃO-DIAS, 2003). Deve ser feito o diagnóstico diferencial com TVT, histiocitoma, sarcomas, melanomas e carcinomas pobremente diferenciados (CONROY, 1983).

O tumor venéreo transmissível é um tumor que se localiza principalmente na mucosa da genitália externa de cães de ambos os sexos, embora também haja relatos de ocorrências extragenitais, tais como nas cavidades oral e nasal, regiões anal e perianal, conjuntiva ocular, pele e linfonodos (HARMELIN, ZUCKERMAN, NYSKA, 1995; MARCHAL *et al.* 1997; PÉREZ *et al.* 1998). Apesar dos muitos estudos estruturais e ultra-estruturais do TVT espontâneo e experimental, a origem celular deste tumor parece incerta; hoje a principal suspeita é que tenha origem histiocítica. Deve-se realizar o diagnóstico diferencial deste tumor com linfomas,

histiocitomas, mastocitomas pouco diferenciados, melanomas amelanóticos e carcinomas indiferenciados (BROWN, CALVERT, MacEWEN, 1980; CONROY, 1983; MOZOS *et al.* 1996).

Durante as últimas décadas a análise de citomorfometria por imagem tem sido usada para estabelecer técnicas no campo da patologia de análise celular. As técnicas usadas com o auxílio do computador são úteis para obter, mensurar, interpretar e gravar (para uma subsequente análise da imagem microscópica) as imagens digitalizadas do material analisado (HAMILTON & ALLEN, 1995; COHEN, 1996).

Algumas das vantagens destas mensurações comparadas à visualização convencional incluem: objetividade, capacidade de reprodução da imagem e a habilidade de detectar mudanças não aparentes pelo método convencional. (HAMILTON & ALLEN, 1995).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfometricamente núcleo e cromatina das células neoplásicas de histiocitoma, mastocitoma e tumor venéreo transmissível de cães e avaliar o potencial deste tipo de análise como ferramenta auxiliar no diagnóstico diferencial destas patologias.

II. REVISÃO DA LITERATURA

Histiocitoma

Os histiocitomas são neoplasias benignas comuns em cães. Sua patogênese não é bem conhecida; evidências de causas infecciosas têm sido relatadas e o tumor não é transmissível por transplante de células (CONROY, 1983; BENDER & MULLER, 1989). Acomete principalmente cães jovens e cerca de 50% dos casos ocorrem em animais com menos de dois anos de idade. Ocasionalmente podem ocorrer em animais mais velhos (CALDERWOOD MAYS & BERGERON, 1986; BENDER & MULLER, 1989; QUEIROZ, 1996; MARTIN DE LAS MULAS *et al.* 1999; MORRIS *et al.* 2000; NAGATA *et al.* 2000; MULLER *et al.* 2001).

Foi comprovado pelos resultados da microscopia eletrônica e histoquímica enzimática que os histiocitomas são derivados de histiócitos (também chamados de macrófagos) (MORRIS *et al.* 2000; MULLER *et al.* 2001). Estas células são macrofágicas e derivadas dos promonócitos da medula óssea (linhagem monócito-macrófago). Os histiócitos são células que atuam em fagocitoses e inflamações, interagem com linfócitos T na resposta imune e possivelmente na prevenção de neoplasias. Contêm grânulos lisossomais que podem ser detectados pelo uso de técnicas específicas de coloração (SHERLIE *et al.* 1992; FOX, 1998).

Os histiocitomas são bem localizados e ocorrem geralmente em orelhas, focinho e extremidades. Envolvimento da córnea e da esclera tem sido relatado, mas é incomum (SHERLIE *et al.* 1992; MORRIS *et al.* 2000; NAGATA *et al.* 2000). Geralmente são pequenos (menos de três centímetros de diâmetro), firmes, em forma de cúpula ou botão, bem circunscritos, de localização dérmica e freqüentemente ulcerados. São de crescimento rápido, porém, com características de tumores benignos (CONROY, 1983; GRAHAN & O'KEEFE, 1998; WILLEMSE, 1998; MULLER *et al.* 2001).

Jovens cães das raças Boxers, Bulldogs, Dobermann Pinschers, Schnauzers, Scottish Terriers e Dachshund são relatados como mais predispostos a histiocitomas. Não há predileção sexual (CONROY, 1983; MULLER *et al.* 2001). Diferentes do TVT, estudos indicam que as células do histiocitoma têm número

normal de cromossomos assim como as células de cão (CONROY, 1983).

O histiocitoma não é encapsulado, mas suas margens são bem definidas (CONROY, 1983; BENDER & MULLER, 1989; SHERLIE *et al.* 1992; MORRIS *et al.* 2000; NAGATA *et al.* 2000). As células podem ter limites confusos, são arredondadas ou ovóides, possuem citoplasma abundante e palidamente corado com núcleo proeminente. Além disso, os histiocitomas caracterizam-se por folhas uniformes e cordões de células histiocíticas pleomórficas infiltrando a derme e o subcutâneo, deslocando as fibras colágenas e anexos (Figura 1) (QUEIROZ, 1996; GRAHAN & O'KEEFE, 1998; MORRIS *et al.* 2000; NAGATA *et al.* 2000; MULLER *et al.* 2001).

Uma característica deste tumor é o elevado índice mitótico, podendo alcançar o número de 10 mitoses por campo de observação em maior aumento. Os histiocitomas também tendem a ser altamente pleomórficos e moderadamente vacuolizados (GRAHAN & O'KEEFE, 1998; MORRIS *et al.* 2000; NAGATA *et al.* 2000; MULLER *et al.* 2001).

Leucócitos e linfócitos freqüentemente têm sido relatados em histiocitomas, sendo os últimos encontrados ao longo da borda profunda do tumor (CONROY, 1983). Infiltração linfocitária e áreas de necrose são comuns em neoplasias em regressão (MORRIS *et al.* 2000; NAGATA *et al.* 2000; MULLER *et al.* 2001).

Histiocitomas podem ser classificados em quatro grupos com base no número e padrão de linfócitos infiltrados. No **Grupo I**, nenhum ou poucos linfócitos são encontrados, quando presentes estes têm distribuição difusa e são vistos na junção periférica da epiderme afetada com a derme normal. Tumores classificados no **Grupo II** têm moderado acúmulo de linfócitos na periferia do tumor com pequeno número estendendo para o centro do mesmo. Histiocitomas classificados como **Grupo III** têm acentuada quantidade de linfócitos com acúmulos nodulares localizados centralmente e periféricamente. Os tumores do **Grupo IV** têm acentuada infiltração linfocítica em número próximo ao de histiócitos, os linfócitos estão em distribuição nodular desde a margem inferior até a superfície epitelial (BENDER & MULLER, 1989).

As diferentes características histopatológicas do tumor podem ser atribuídas a diferentes estágios da vida do histiocitoma; aqueles com longa duração ou em

resolução são classificados nos Grupos III ou IV (FOX, 1998).

Há necessidade de se fazer o diagnóstico diferencial para inflamação focal granulomatosa, mastocitoma, linfossarcoma cutâneo e TVT (CONROY, 1983; QUEIROZ, 1996).

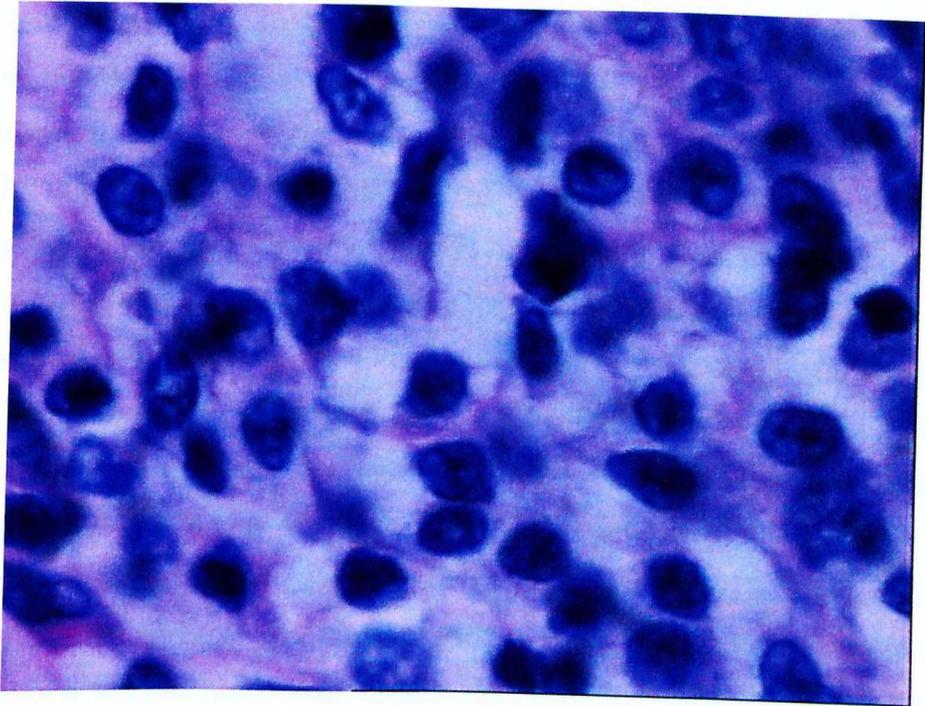


Figura 1: Fotomicrografia do histiocitoma canino em objetiva de 100x.

Mastocitoma

Os mastocitomas são neoplasias comuns de cão e gato e emergem dos mastócitos. Representam de 7 a 22% das neoplasias cutâneas malignas em cães (ROGERS, 1996; GRAHAN & O'KEEFE, 1998; STREFEZZI, XAVIER, CATÃO-DIAS, 2003).

A causa ainda é desconhecida, no entanto, predisposição racial, inflamação crônica e vírus podem exercer algum papel. Os Boxers, Boston Terrier, Bulldogs Ingleses e Bull Terrier têm maior predisposição. Estudos experimentais nos quais os cães desenvolveram este tumor após receberem injeções de extratos tumorais sem células levaram à especulação de que vírus possam exercer um papel como precursores dos mastocitomas (GRAHAN & O'KEEFE, 1998; WILLENSE, 1998; MAYR *et al.* 1999, MULLER *et al.* 2001; STREFEZZI, XAVIER, CATÃO-DIAS, 2003).

Os mastocitomas ocorrem freqüentemente em cães com média de oito anos de idade, mas também são relatados em filhotes. Seu aspecto clínico é variável. As lesões podem ser firmes ou amolecidas, papulares, nodulares ou pedunculadas, de localização dérmica a subcutânea, bordas razoavelmente definidas, variando de poucos milímetros a vários centímetros de diâmetro (MAYR *et al.* 1999; MULLER *et al.* 2001). Geralmente são solitários, mas podem ser em maior número ou multicêntricos, ocorrem em qualquer região, mas são mais comuns na metade caudal do corpo (períneo, membros posteriores e genitália) (GRAHAN & O'KEEFE, 1998, MULLER *et al.* 2001, STREFEZZI, XAVIER, CATÃO-DIAS, 2003).

Estudos sugerem que os tumores nas áreas prepucial, inguinal e perineal podem ser mais malignos (GRAHAN & O'KEEFE, 1998; MULLER *et al.* 2001).

A superfície de corte deste tumor é usualmente marrom amarelado ou esverdeado, podendo ser avermelhado caso haja hemorragia. Não são encapsulados, mas os tumores com crescimento lento têm suas margens mais definidas do que os de crescimento rápido (BOSTOCK & OWEN, 1975).

Os mastocitomas caracterizam-se por proliferação difusa a multinodular de mastócitos. As células são relativamente grandes, ovóides ou redondas com núcleo oval ou redondo e alguns nucléolos. Grãos de metacromatina citoplasmática são evidentes após coloração com Giemsa ou Azul de Toluidina em cortes ou em esfregaço de impressão destes tumores (Figura 2) (CONROY, 1983).

Freqüentemente visualiza-se em mastocitomas eosinofilia tecidual, áreas focais de degeneração colágena e ampla variedade de lesões vasculares. Em pacientes com este tumor, eosinófilos podem estar presentes em grande número na população celular por causa de sua atração pela histamina. Figuras de mitose são raras e as células podem ser separadas por um grande espaço. Tumores pobremente diferenciados podem conter células bizarras com um grande e irregular núcleo, citoplasma escasso e numerosas mitoses (BOSTOCK & OWEN, 1975, MULLER *et al.* 2001).

Quando realizada ressecção cirúrgica completa, estes tumores têm um bom prognóstico com um longo tempo de sobrevida. Eventualmente estes tumores são encontrados em locais onde a excisão completa não é possível ou já ocorreram metástases, resultando em um mau prognóstico (ROGERS, 1993).

Deve ser feito o diagnóstico diferencial com: TVT, histiocitoma, sarcomas, melanomas e carcinomas pobremente diferenciados (CONROY, 1983).

Três graus histológicos de malignidade para mastocitomas caninos foram estabelecidos por Patnaik, Ehler e MacEwen (1984): **Grau I** - tumores bem diferenciados: com limite citoplasmático claramente definido, núcleo regular, esférico ou ovóide, figuras mitóticas raras, grandes grânulos citoplasmáticos, coloração intensa; **Grau II** - tumores compostos de células moderadamente diferenciadas: células agrupadas, com limites citoplasmáticos indistintos, figuras mitóticas infreqüentes e presença de grânulos citoplasmáticos e **Grau III** - tumores pobremente diferenciados ou com células anaplásicas, altamente celular, limites citoplasmáticos indistintos, tamanhos e formas irregulares dos núcleos, figuras mitóticas muito freqüentes, baixo número de grânulos citoplasmáticos (FOX, 1998, GRAHAN & O'KEEFEN, 1998, MULLER *et al.* 2001). Cerca de 38% dos tumores são de Grau I, 40% dos tumores são de Grau II e 22% são de Grau III (SIMÕES, SCHONING, BUTINE, 1994)

Em um estudo de Strefezzi, Xavier e Catão-Dias (2003), 24 casos de mastocitoma foram submetidos a três diferentes e experientes patologistas para diferenciar o grau dos tumores. Houve discordância em 50% dos casos de diagnóstico.

Deve-se fazer uma tentativa de se classificar todos os mastocitomas, pois a classificação afeta o prognóstico e as decisões terapêuticas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu um sistema de classificação clínica para os mastocitomas caninos demonstrado na Tabela 1.

Alguns fatores podem ser importantes no prognóstico dos mastocitomas caninos como o tamanho e a localização do tumor, a duração da doença e a presença ou não de metástase. Cães com pequenas massas e de longa duração, localizadas em extremidades têm significativamente maior média de tempo de sobrevivência. Pacientes com tumores com crescimento lento ou que já tem o tumor há longo período de tempo tem um melhor prognóstico e aqueles com crescimento tumoral rápido ou infiltrativo tem um prognóstico desfavorável (ROGERS, 1996).

Tabela 1: Sistema de classificação clínica da Organização Mundial de Saúde (OMS) para os mastocitomas caninos (ROGERS, 1996, FOX, 1998, GRAHAN & O'KEEFE, 1998).

ESTÁGIO*	CARACTERÍSTICAS
I	Um tumor dérmico sem envolvimento linfonodal regional
II	Um tumor dérmico com envolvimento linfonodal regional
III	Tumores dérmicos múltiplos ou um grande tumor infiltrativo com ou sem envolvimento linfonodal regional
IV	Qualquer tumor com metástase distante ou recorrência com metástase

Os estágios subdividem-se em sem sinais sistêmicos e com sinais sistêmicos.

Em estudo histológico de mastocitomas, Simões *et al.* (1994) observaram que o tamanho das células foi uniforme em 48,3% dos casos de tumor, anisocitose estava presente em 26,4% e anisocitose com células gigantes foram presentes em 25,3% dos casos. Células foram uniformes quanto à forma em 52,9% e citoplasma abundante estava presente em 83,9% dos casos. O tamanho do núcleo foi uniforme em 41,1% dos casos e redondo ou oval em 60,9%. O nucléolo não foi visível em 69% dos casos e 3,4% das células tinham mais de um nucléolo.

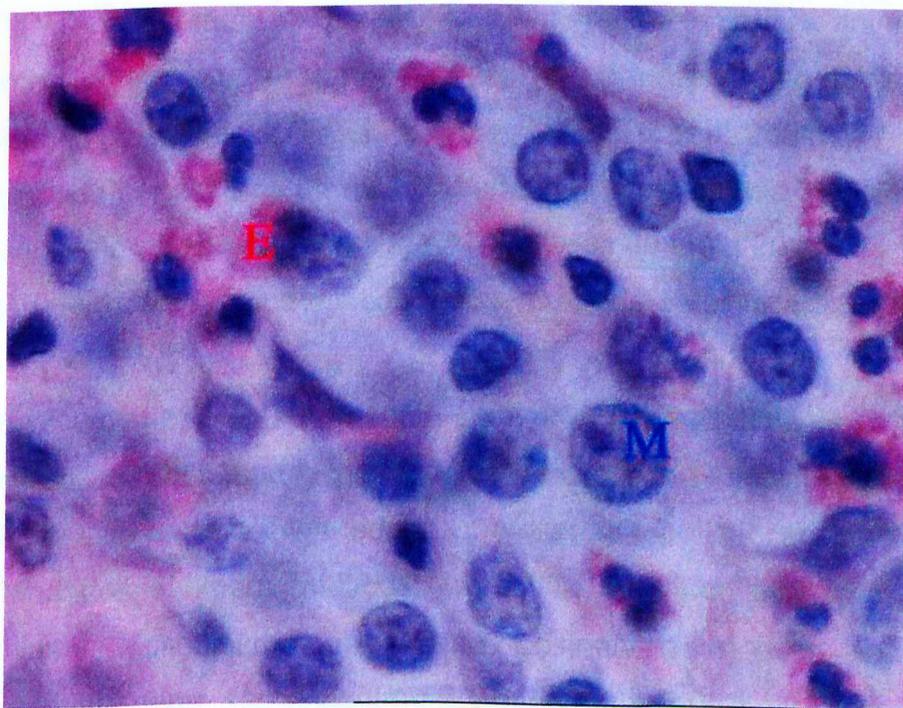


Figura 2: Fotomicrografia de mastocitoma canino em objetiva de 100x. (A letra E marca um eosinófilo e a letra M marca uma célula neoplásica de mastocitoma).

Tumor venéreo transmissível

O TVT é uma neoplasia de células redondas de ocorrência freqüente, que se localiza principalmente na mucosa da genitália externa de cães de ambos os sexos, embora também existam relatos de ocorrências extragenitais nas cavidades oral e nasal, regiões anal e perianal, conjuntiva ocular, pele e linfonodos (HARMELIN, ZUCKERMAN, NYSKA, 1995; MARCHAL *et al.* 1997; PÉREZ *et al.* 1998; GONZALEZ *et al.* 2000).

É transmitido por via venérea mediante o transplante de células tumorais viáveis de indivíduos afetados, e não por meio de agente infeccioso, caracterizando assim um transplante celular halogênico (ROGERS, WALKER, DILLON, 1998). Basta o contato de uma estrutura tumoral com uma mucosa normal, ainda que fora do aparelho genital, para estabelecer a transferência. Portanto, a implantação pode ocorrer nas membranas mucosas durante o coito, lambeduras, mordeduras ou pelo ato de cheirar um animal portador (BROWN, CALVERT, MacEWEN, 1980, GRAHAN & O'KEEFE, 1998; MULLER *et al.* 2001; VARASCHIN *et al.* 2001; ALBANESE *et al.* 2002).

Ocorrendo em caninos sexualmente ativos (especialmente os jovens e de vida livre), o TVT não demonstra predileção por raça ou sexo. Os animais com saúde deficiente ou imunossupressão podem ser mais predispostos a apresentarem lesões metastáticas (GRAHAN & O'KEEFE, 1998; MULLER *et al.* 2001).

O tumor pode ser simples ou múltiplo, nodular, pedunculado, multilobular ou em forma de couve-flor, freqüentemente friável, variando de um a 20 cm de diâmetro com localização dermoepidérmica e freqüentemente pode estar ulcerado (MULLER *et al.* 2001).

Microscopicamente, o TVT apresenta-se como massas celulares compactas, em cordões ou soltas, sustentadas por finas trabéculas de tecido fibrovascular. A morfologia celular varia entre células redondas, ovaladas e poliédricas, com grandes núcleos arredondados e hipercromáticos, cromatina marginal distinta e nucléolo central proeminente, citoplasma fracamente eosinofílico e pode ter bordas indefinidas. Freqüentemente são encontradas abundantes figuras de mitose (Figura 3) (MOULTON, 1990; MOZOS, *et al.* 1996; HAHN, 1998).

As células tumorais contêm 59 cromossomos e o número canino normal é de

78 cromossomos, sendo que este cariótipo consiste de 17 cromossomos metacêntrico e 42 cromossomos acrocêntrico (BROWN, CALVERT, MacEWEN, 1980; HAHN, 1998; MULLER *et al.* 2001; VARASCHIN *et al.* 2001).

Os tumores sofrendo regressão espontânea exibem necrose, numerosos feixes colágenos e aumento no número de leucócitos infiltrantes, especialmente linfócitos (MULLER *et al.* 2001).

A não transmissão do TVT entre caninos é atribuída à imunidade adquirida pelo receptor (MULLER *et al.* 2001; VARASCHIN *et al.* 2001). Achados sugerem que não somente os linfócitos T têm importante papel na regressão espontânea deste tumor, mas também as células B; os plasmócitos, que produzem IgG, IgG2 e IgG4, e os macrófagos participam na resposta imune efetiva contra este tumor (VARASCHIN *et al.* 2001).

Apesar dos muitos estudos estruturais e ultra-estruturais do TVT espontâneo e do experimental, a origem celular deste tumor parece incerta. Células neoplásicas expressam imunoreatividade a lisozima alfa-1-antitripsina que é um marcador de macrófago (ALBANESE *et al.* 2002), o que sugere que o tumor tenha uma origem histiocítica (MOZOS *et al.* 1996; VARASCHIN *et al.* 2001).

Normalmente o diagnóstico deste tumor se dá clinicamente ou associado com histopatologia. Contudo, quando localizado fora do aparelho genital, estes métodos mostram-se pouco confiáveis, necessitando de técnicas complementares, tais como imunocitoquímica, morfometria nuclear e microscopia eletrônica (HARMELIN, ZUCKERMAN, NYSKA, 1995).

Em casos atípicos deve-se realizar o diagnóstico diferencial com outros tumores de células redondas que acometem esta espécie, como linfomas, histiocitomas, mastocitomas pobremente diferenciados, melanomas amelanóticos ou carcinomas indiferenciados (BROWN, CALVERT, MacEWEN, 1980; CONROY, 1983; MOZOS *et al.* 1996).

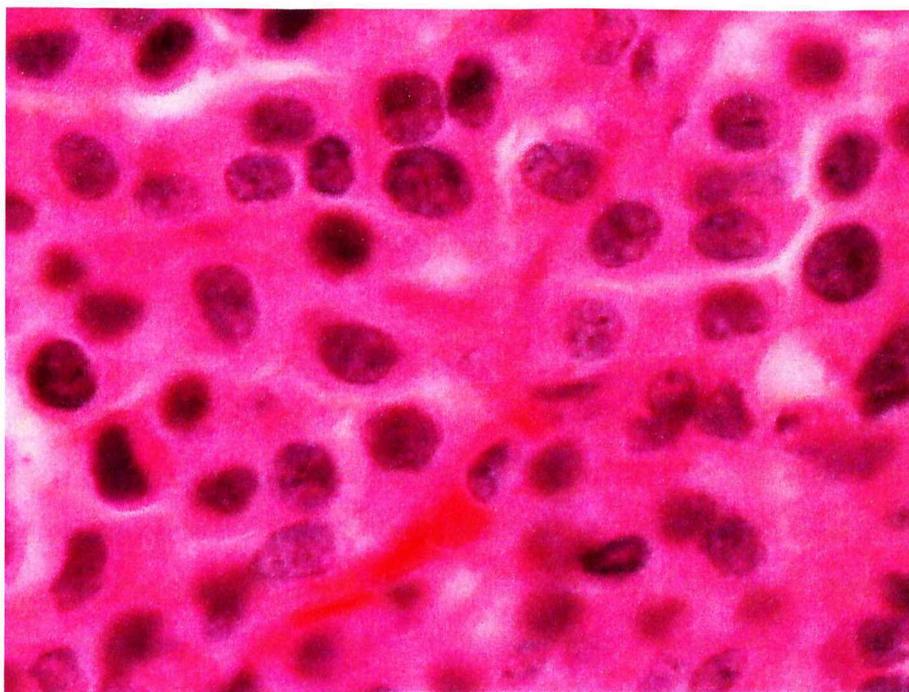


Figura 3: Fotomicrografia de TVT em objetiva de 100x.

Citomorfometria em patologia

Em patologia, mudanças citomorfológicas como alterações nucleares em doenças neoplásicas ou mudanças degenerativas, são importantes como auxílio nos métodos diagnósticos (DeNICOLE & REAGAN, 1998). Contudo, a histopatologia de rotina não consegue uma avaliação objetiva destas mudanças. A morfometria é uma alternativa para tornar esta avaliação mais objetiva. Mesmo antes do advento do computador esta técnica era considerada simples, barata e não necessitando de equipamentos sofisticados (BAAK *et al.* 1985).

Durante as últimas décadas a citomorfometria por análise de imagem computadorizada tem sido usada para estabelecer técnicas no campo da patologia de análise celular. As técnicas usadas com o auxílio do computador são úteis para obter, mensurar, interpretar e gravar (para uma subsequente análise da imagem microscópica) as imagens digitalizadas do material (HAMILTON & ALLEN, 1995; COHEN, 1996).

Algumas das vantagens das mensurações comparadas à visualização convencional incluem: objetividade, capacidade de reprodução da imagem e a habilidade de detectar mudanças não aparentes pelo método convencional

(HAMILTON & ALLEN, 1995).

Basicamente a técnica consiste na figura microscópica real sendo convertida à imagem digital e dividida em grade ou pixel (figuras de elementos ou subunidade) arranjados em colunas e linhas, como partes individuais de um mosaico. Quanto maior o número de pixels na imagem melhor será a resolução (HAMILTON & ALLEN, 1995; COHEN, 1996).

Em patologia a análise de imagem, além de fornecer mensurações básicas das células tumorais, pode ser usada em tumores para identificar e quantificar a "ploidia" nuclear, receptores nucleares marcados por imunocitoquímica, marcadores imunológicos de células endoteliais e oncogenes (SHAN *et al.* 1995; COHEN, 1996). Em tumores, a desvantagem do sistema de graduação por histopatologia convencional é sua natureza subjetiva. De acordo com estudos, a concordância entre patologistas na graduação de tumores raramente excede 80 a 90% dos casos (BAAK *et al.* 1985). A morfometria permite uma avaliação objetiva de alterações histopatológicas, diminuindo o alto grau de subjetividade da avaliação visual realizada pelo patologista, por confirmar e classificar os tipos celulares de acordo com suas características morfológicas. Além disso, esta avaliação permite freqüentemente a subclassificação de tumores. Morfometria tem se mostrado útil também como um apurado indicador de prognóstico (BAAK *et al.* 1985; GHALI *et al.* 1992; HAMILTON & ALLEN, 1995; COHEN, 1996; MINKUS *et al.* 1997).

Pode-se usar como técnicas para mensurações morfométricas as mensurações lineares, estereologia, sistemas computadorizados interativos e imagens computadorizadas processadas e analisadas automaticamente (HAMILTON & ALLEN, 1995).

O sistema interativo consiste de uma caneta eletromagnética ou mouse, ligado a um computador, através do qual é desenhado um traço ou marcado um objeto que posteriormente será mensurado ou contado. O computador calcula as dimensões ou o número de objetos destacados e armazena estes dados. Sistemas como estes comumente são usados na coleção de dados histo e citomorfométricos e em particular para o exame das características de núcleos (HAMILTON & ALLEN, 1995).

O futuro da morfometria microscópica em patologia inclui a padronização de

novas técnicas para sub-classificação de tumores, diagnóstico, prognóstico, ajuda em decisões terapêuticas e reconstruções de imagens tri-dimensionais a partir de cortes bi-dimensionais. Esta metodologia tem sido útil para identificar bordas pré-cancerígenas em casos de tumores com baixo potencial maligno ou em áreas de locais de riscos (HAMILTON & ALLEN, 1995; COHEN, 1996).

No caso de tumores malignos é possível avaliar as condições de cada população celular e os diferentes graus de pleomorfismo. Nestes, a uniformidade celular geralmente está perdida e em casos de tumores pobremente diferenciados o grau de pleomorfismo pode ser tão severo que dificulta até mesmo a identificação do tipo de tecido envolvido. Em tecidos normais, hiperplasias ou tumores benignos, o tamanho nuclear geralmente é uniforme. Mas, em casos de tumores malignos, o tamanho do núcleo pode ser entre uma vez e meia a duas vezes o tamanho normal (DeNICOLE & REAGAN, 1998).

Alterações na morfologia nuclear têm sido importantes na patologia do câncer de mama. Nestes casos, o aumento na área nuclear está correlacionado com a diminuição no tempo de sobrevivência. A quantificação de parâmetros nucleares é uma ferramenta muito útil no diagnóstico e prognóstico destes tumores (PIENTA & COFFEY, 1991).

Geralmente o diagnóstico histopatológico de rotina é suficiente para diferenciar histiocitoma, mastocitoma e TVT. Contudo, algumas vezes este método torna-se ineficaz para o diagnóstico diferencial, principalmente quando o TVT primário não se localiza na genitália. A morfometria citológica destes tumores pode ser útil nestes casos e em casos onde há dúvidas quanto ao diagnóstico. Contudo, para a utilização de tal metodologia é indispensável uma caracterização morfométrica prévia destes tumores.

III. MATERIAL E MÉTODO

Material biológico

Foram utilizadas 15 lâminas de histiocitoma, 15 lâminas de mastocitoma e 15 lâminas de TVT, provenientes do arquivo do Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. Todas as lâminas estavam coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), tinham sete micrômetros de espessura e eram originadas de casos com diagnóstico clínico e histopatológico de histiocitomas e mastocitomas localizados na pele de cães e TVT localizados na genitália externa.

Estas lâminas foram pré-selecionadas, sendo escolhidas as lâminas com melhor qualidade de corte, coloração e característica do tumor. Para verificação do tipo de tumor, estas lâminas foram avaliadas por dois patologistas experientes e somente as lâminas em que houve concordância no diagnóstico foram utilizadas.

Captura e processamento das imagens

Todos estes cortes histológicos foram analisados através de imagens digitalizadas obtidas em microscópio Olympus Triocular BX40 acoplado a câmera Oly-200, ligada a um computador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153. As imagens foram obtidas com o microscópio em objetiva de imersão de 100x.

As imagens capturadas foram em número suficiente para que 100 núcleos de células tumorais de cada caso fossem segmentados.

Os núcleos foram segmentados em um processo interativo utilizando o software Gimp, produzindo uma figura em escala de cinza. Esta nova figura em tons de cinza foi recortada e colocada em outra figura com o fundo branco de tamanho 200 x 200 pixels. Tomou-se o cuidado de se segmentar somente núcleos de células tumorais e não sobrepostos. É importante salientar que as imagens em tons de cinza possuem valores de pixel entre zero (preto absoluto) e 255 (branco).

As regiões correspondentes ao nucléolo e regiões de heterocromatina, de coloração mais escura, foram denominadas Regiões de Interesse e abreviadas como ROI ("Region of Interest"). Para selecionar estes ROIs calculou-se o valor médio dos pixels que formava a imagem do núcleo e posteriormente todo pixel que estivesse abaixo de 84% deste valor médio foi transformado em preto e o restante em branco. Desta forma somente as partes mais escuras da figura ficam visíveis. Para escolher o valor de referência para gerar os ROIs foi realizado diversos testes, sendo escolhido 84% do valor médio dos pixels porque este valor geralmente faz com que os nucléolos tornem-se ROIs isolados daqueles formados pela heterocromatina periférica. Inicialmente, escolheu-se como valor de referência o valor médio dos tons de cinza e observou-se que o nucléolo não se separava da heterocromatina e uma grande quantidade de eucromatina era erroneamente identificada como heterocromatina. Assim, foram realizados novos testes utilizando-se como valor de referência diferentes porcentagens do valor médio dos tons de cinza. A cada novo valor de referência, cerca de 100 núcleos escolhidos aleatoriamente de diversos casos eram avaliados quanto à separação do nucléolo e quanto à preservação das características da heterocromatina. Este processo foi realizado diversas vezes, até verificar-se que o valor de 84% da média era o que melhor preservava as características da heterocromatina e separava o nucléolo.

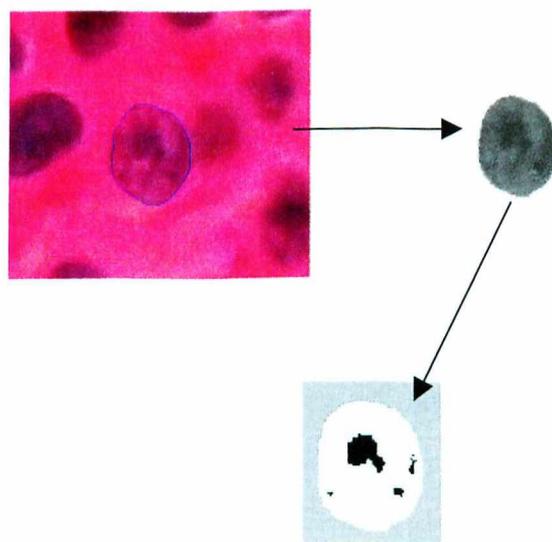


Figura 4: Imagem do núcleo segmentado seguido do núcleo em tons de cinzas.

Análise das imagens

A análise das características dos núcleos foi realizada por rotinas desenvolvidas no ambiente de programação Scilab. Uma vez que os tumores analisados apresentam grande pleomorfismo, torna-se difícil apenas pela análise dos cortes à microscopia de luz definir quais características dos núcleos seriam mais importantes na diferenciação dos tumores. Sendo assim, inicialmente foram avaliadas somente as medidas básicas mais freqüentemente utilizadas em patologia: área (a), perímetro (p) e elipsidade (e). Posteriormente, foram realizadas outras medidas nucleares mais elaboradas e medidas dos ROIs, citadas a seguir: largura (l), comprimento (c), razão largura /comprimento (l/c), número de ROIs (nR), área média dos ROIs (aR), perímetro médio dos ROIs (pR), distância média dos centros de massa dos ROIs ao centro de massa do núcleo (dmR), distância do centro de massa do principal ROI ao centro da massa do núcleo (dpR), alongamento do principal ROI (apR), alongamento médio dos ROIs (amR), lacunaridade (lc), primeiro e segundo autovalores da matriz de distância (paR) e (saR), média da razão de ocupação dos ROIs (moR), desvio padrão da razão de ocupação dos ROIs (doR) e razão espectral da distância (redR).

Uma vez obtido estas medidas foi verificado o grau de entropia, para quantificar o pleomorfismo nuclear em cada caso.

A seguir está detalhado como estas características foram calculadas.

1- Área (a)

Quando uma imagem é digitalizada, ele passa a ser interpretada pelo computador como uma matriz.

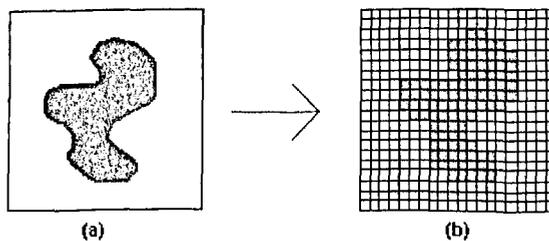


Figura 5: (a)– Imagem do objeto original, (b) – Imagem do objeto depois da digitalização (forma discreta).

Cada elemento $a(i, j)$ dessa matriz é denominado pixel.

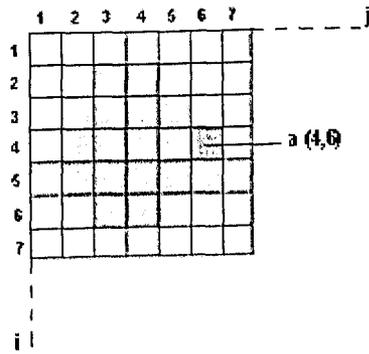


Figura 6: Representação de uma imagem através de uma matriz

A área de uma imagem é dada pela soma de todos os pixels que a compõe.

2- Perímetro (p)

Define-se o contorno da imagem, seqüenciando os pixels da borda, como na

figura:

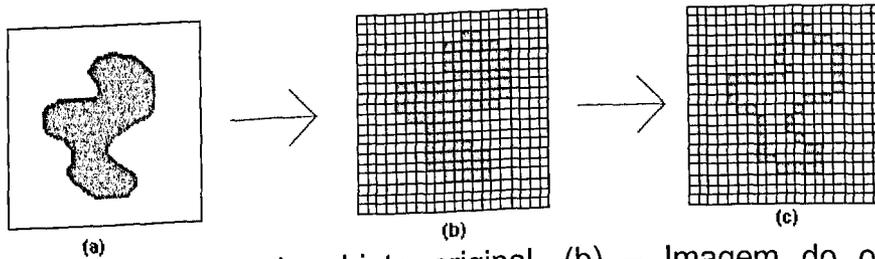
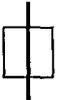
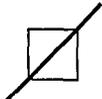


Figura 7: (a) Imagem do objeto original, (b) – Imagem do objeto depois da digitalização (forma discreta), (c) – Contorno da imagem digitalizada.

Vemos na figura 7(c) três tipos de ligação entre os pixels: vertical (a), horizontal (b) e diagonal (c). A contribuição (C) de cada ligação (ligações sujeitas a rotações) ao comprimento total do contorno é dada por:

 (a) e  (b) contribuição no comprimento total $C = 1$.

 (c) contribuição no comprimento total $C = \sqrt{2}$.

Desta maneira o perímetro é aproximado por:

$$P = na + nb\sqrt{2}$$

onde, "P" o valor do perímetro, "na" é o número de pixels em ligações horizontais e verticais e "nb" é o número de pixels em ligações diagonais.

3- Largura (l) e Comprimento (c)

O centro de massa de cada núcleo foi determinado e o núcleo foi transladado a uma posição onde o novo centro de massa corresponda à origem dos eixos da coordenada Cartesiana. Tendo normalizado a posição do núcleo, sua principal orientação foi encontrada usando análise de componentes principais (PCA). Este processo envolve a matriz de covariância das coordenadas dos pixels que compõem o núcleo; foram determinados seus auto-valores e seus auto-vetores e usado os últimos para definir uma transformação linear que rotaciona o objeto original, deixando o eixo x alinhado ao longo da orientação da máxima dispersão. Os dois auto-valores obtidos dão as respectivas máxima e mínima dispersão no novo sistema de coordenada.

Após reposicionar o objeto, a projeção dos pixels no eixo x permite determinar o comprimento do núcleo e a projeção no eixo y corresponde ao valor da largura.

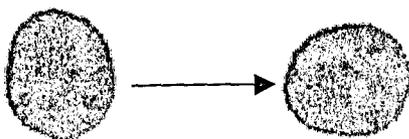


Figura 8: Imagem original do núcleo antes e após o reposicionamento do núcleo para a verificação da largura e do comprimento do núcleo.

4- Largura/Comprimento (l/c)

É o resultado da divisão dos valores obtidos no cálculo da largura pelo valor obtido no cálculo do comprimento.

5- Elipsidade (e)

Elipsidade é descrita como a média do alongamento ao redor do núcleo, normalizada entre $0 < e < 1$, ela é definida como:

$$e = (c-l)/(c+l)$$

6- Número de ROIs (nR)

Após determinar os ROIs é contada a quantidade destas manchas:

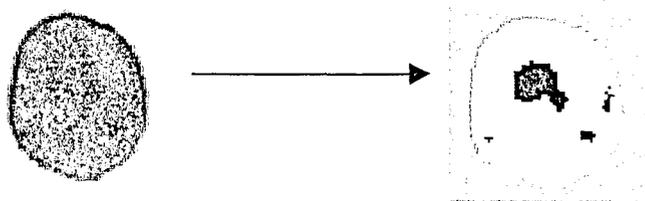


Figura 9: Representação dos ROIs contidas em uma imagem.

7- Área média dos ROIs (aR)

Mensurou-se a área de todos os ROIs de um núcleo e em seguida calculou-se a média destas áreas.

8- Perímetro médio dos ROIs (pR)

Média dos perímetros dos ROIs dentro de um núcleo.

9- Distância média entre os centros de massa dos ROIs e o centro de massa do núcleo (dmR).

Calcula-se a distância entre o centro de massa de cada ROI ao centro de massa do núcleo e obtém-se a média destes valores.



Figura 10: Representação da distância dentre os ROIs e o centro do núcleo.

Coordenadas do centro de massa da célula: (X_{cm}, Y_{cm})

Coordenadas do centro de massa do n-ésimo ROI: (X_{cmn}, Y_{cmn})

$$D_n = \sqrt{(X_{cmn} - X_{cm})^2 + (Y_{cmn} - Y_{cm})^2}$$

Em seguida, no caso de haver mais de um ROI, tiramos a média destes valores.

$$D_{\text{médio}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n D_i$$

10- Distância entre o centro de massa do principal ROI e o centro de massa do núcleo (dpR).

Calcula-se a distância do centro de massa do principal ROI ao centro de massa do núcleo.

11- Alongamento do principal ROI (apR) e alongamento médio dos ROIs (amR)

Por meio da análise dos componentes principais (PCA) (COSTA & CESAR JR, 2001), é determinado o eixo principal do ROI e o eixo secundário perpendicular. A razão entre estes determina o alongamento do ROI, sendo que quanto mais próximo de 1, mais esférico ele é. Calculando-se o alongamento de cada ROI foi possível calcular-se o alongamento do principal ROI e o alongamento médio de todos os ROIs.

12- Lacunaridade (lc)

Usamos uma “caixa” de $s \times s$ inicialmente colocada no canto superior esquerdo da imagem contendo os ROIs. A somatória dos valores dos pixels dentro da caixa é calculada à medida que a caixa é movida pixel por pixel para a direita. O resultado da somatória de cada posição da caixa que estiver totalmente sobre o núcleo é armazenado em um vetor S. Foi utilizado valores de s variando de 2 em 2 pixel, com mínimo 2 e máximo 20 pixels. Para cada valor de s a lacunaridade foi calculada como: $L_s = \log\left(\frac{\sigma}{m^2}\right)$, onde σ é o desvio padrão e m é a média de S

(EINSTEIN *et al.* 1998). A lacunaridade de cada núcleo foi definida como $L = \int_2^{20} L_s ds$.

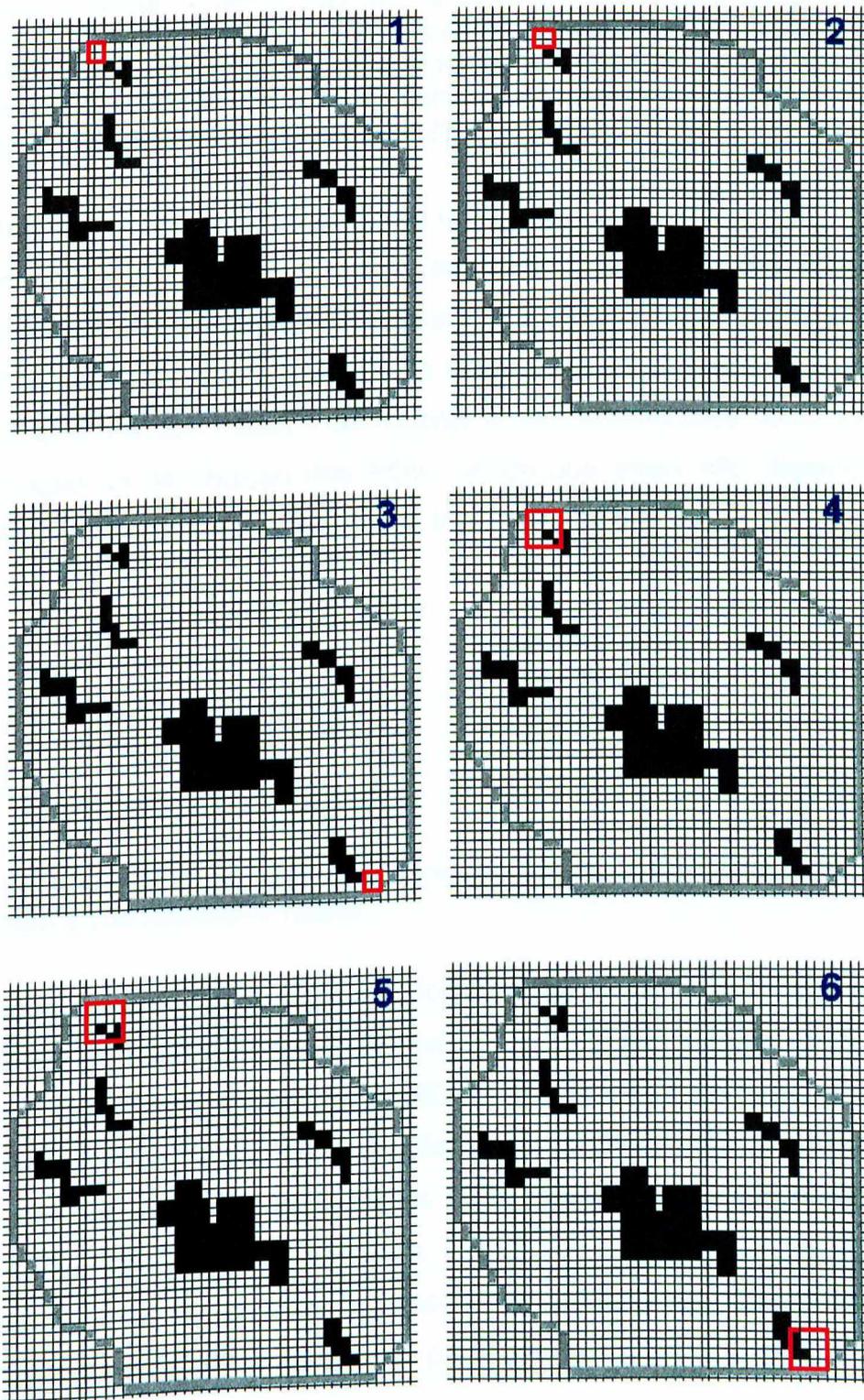


Figura11: Esquema representativo de como foi calculada a lacunaridade do núcleo (a caixa $s \times s$ é colocada inicialmente no canto superior esquerdo da imagem, mas, somente os valores encontrados dentro do núcleo são considerados na formação do vetor): 1- primeira posição da “caixa” com 2×2 pixels que será considerada na formação do vetor S ; 2- a “caixa” se move

1 pixel à direita; 3- última posição da caixa que participará da formação do vetor S com 2 x 2 pixels; 4- Reinício com "caixa" 4 x 4 pixels (a "caixa" aumenta de 2 em 2 pixels); 5- deslocamento da caixa 4 x 4 pixels para a direita; 6- fase final formação do vetor S com "caixa" 4 x 4 pixels. Assim o processo se repete até a caixa 20 x 20 pixels.

13- Autovalores da matriz de distância (paR e saR)

Foram obtidas as distâncias entre cada centro de massa dos ROIs e do centro de massa da célula e foi montada uma matriz de distâncias, sendo esta uma matriz simétrica. Foram então calculados os autovalores desta matriz e ordenados decrescentemente. Os dois maiores autovalores foram considerados como variáveis de caracterização da distribuição dos ROIs, sendo que estes não dependem da ordem dos ROIs e são invariantes à rotação, translação e reflexão.

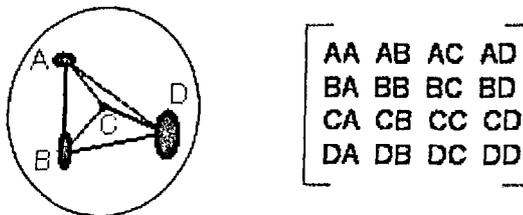


Figura 12: Representação da distância entre os centros dos ROIs e o núcleo da célula e sua respectiva matriz.

14- Média e desvio padrão da razão de ocupação dos ROIs (moR e doR).

Promoveu-se a dilatação dos ROIs pixel a pixel, até que estes preenchessem toda a célula. O local onde a dilatação de ROIs vizinhos se tocam forma uma linha que demarca o limite da "região de ocupação" destes ROIs. Assim, o conjunto das linhas formadas pela dilatação de todos os ROIs forma uma divisão territorial do núcleo para cada ROI. A razão de ocupação é a divisão da área ocupada pelo ROI por sua área territorial. Foram considerados como variáveis de caracterização de textura do núcleo a média (moR) e o desvio padrão da razão de ocupação dos ROIs (doR) (COSTA, 1999)

Figura 13: Representação da região de ocupação de um ROI. A1 é a área do ROI e A2 é a área da ocupação do ROI.

15- Razão espectral da distância (redR)

É a razão entre os dois autovalores da matriz de distâncias (menor pelo maior).

16- Entropia

A entropia das características morfométricas de cada caso foi calculada para determinar o pleomorfismo. Dado uma probabilidade de densidade estatística $p(f_1, f_2, \dots, f_N)$ descrevendo as N medidas observadas (f_i), a entropia E de cada distribuição, obtida da frequência relativa do histograma, pode ser calculada pelo uso da equação a seguir. A entropia mínima (zero) deve ser obtida caso toda observação for caracterizada por valores constantes. Uma alta entropia seria obtida com uma alta distribuição de observações ao longo do espaço mensurado.

$$E = - \sum \sum \dots \sum p(f_1, f_2, \dots, f_N) \log \{ p(f_1, f_2, \dots, f_N) \} df_1 df_2 \dots df_N$$

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa S-PLUS. Foi realizada análise de variância, pelo método ANOVA e T de Student para diferenças entre médias para as medidas obtidas em cada tipo de tumor.

Também foram realizadas análises discriminantes canônicas para as seguintes situações:

(3M3T): Área, perímetro e elipsidade para os três tipos de tumores (duas funções).

(TM3T)- Todas as medidas para os três tipos de tumores (duas funções).

(TM2T)- Todas as medidas analisadas e todos os casos de histiocitoma e de TVT (uma função).

Destas análises foram criadas funções discriminantes, a partir das quais foram obtidas as variáveis canônicas para cada célula. Para tal multiplicou-se o valor de cada medida de um determinado núcleo pelo coeficiente canônico equivalente, sendo a somatória dos valores obtidos a variável canônica deste núcleo.

Por exemplo: um determinado núcleo de mastocitoma possui área igual a 1753,00 pixels, perímetro igual a 159,05 pixels e elipsidade igual a 0,20. Quando se considera a função discriminante obtida na situação em que os três tumores foram analisados através das medidas básicas, deve-se usar a função canônica para esta situação. A função então ficaria assim: $(-0,0006.1753) + (-0,0233.159,05) + (-3,442.0,20) = -4,43$ é a variável canônica deste núcleo, onde os valores marcados em azul são os coeficientes canônicos desta situação e os em preto são originados das análises do núcleo. Para cada núcleo é possível obter uma ou duas variáveis canônicas dependendo da situação.

Estas novas variáveis, calculadas a partir de todas as medidas, otimizam a capacidade de uma correta classificação. Calculando-se o coeficiente de correlação entre as características morfométricas e as variáveis canônicas foi possível determinar a estrutura canônica. O valor absoluto destes coeficientes permite verificar o quanto cada variável mensurada influenciou na formação da variável canônica. Quanto maior valor, maior é a participação de uma determinada variável (medida).

Após a obtenção das funções discriminantes foram calculados os erros estimados. Estes valores são referentes ao erro encontrado após uma reclassificação dos núcleos usando as variáveis canônicas, desconsiderando as variáveis iniciais. O erro estimado é a porcentagem de núcleos que não foram corretamente classificados. Pode-se obter o erro estimado na reclassificação dos núcleos de cada tipo de tumor e o erro total, onde são considerados os erros ocorridos nos tipos de tumores analisados.

Na tentativa de melhor verificar a eficiência da função discriminante na separação dos tumores foi realizado a "cross-validation". Neste método uma amostra

das células é excluída e a função discriminante é re-estimada. A partir do resultado encontrado na análise discriminante, as células retiradas são re-classificadas e o erro na classificação é calculado. Uma vez calculado o erro, estas células retornam para os dados iniciais e outra amostra é retirada. Isso se repete exaustivamente até que todas as células tenham sido re-classificadas usando este método. O erro final é a média dos erros obtidos.

IV. RESULTADOS

As médias, desvios padrões e a existência de diferenças entre as médias das medidas de cada tipo de tumor, obtidas através de análise de variância (ANOVA) estão demonstradas na Tabela 2:

Tabela 2: Média e desvio padrão das medidas usadas nos três tipos de tumores

Medidas	Média e desvio padrão		
	Histiocitoma	Mastocitoma	TVT
a (μm^2)	32,41 ^a ± 84,92	26,43 ^b ± 6,38	29,18 ^c ± 7,06
p (μm)	20,86 ^a ± 2,80	18,83 ^b ± 2,31	19,77 ^c ± 2,45
e	0,13 ^a ± 0,07	0,12 ^a ± 0,06	0,11 ^b ± 0,05
l (μm)	5,66 ^a ± 0,89	5,14 ^b ± 0,75	5,46 ^c ± 0,80
c (μm)	7,29 ^a ± 1,05	6,57 ^b ± 0,86	6,82 ^c ± 0,86
l/c	0,78 ^a ± 0,10	0,78 ^a ± 0,10	0,80 ^b ± 0,09
nR	3,90 ^a ± 2,31	3,42 ^b ± 2,14	3,81 ^a ± 2,14
aR (μm^2)	1,12 ^a ± 1,32	1,52 ^b ± 2,02	1,12 ^a ± 1,33
pR (μm)	6,81 ^a ± 5,00	8,62 ^b ± 7,23	6,77 ^a ± 5,82
dpR (μm)	1,51 ^a ± 0,82	1,21 ^b ± 0,63	1,32 ^c ± 0,67
dmR (μm)	1,84 ^a ± 0,82	1,48 ^b ± 0,58	1,70 ^c ± 0,57
apR	0,33 ^a ± 0,20	0,37 ^b ± 0,21	0,41 ^c ± 0,22
amR	0,30 ^a ± 0,14	0,32 ^b ± 0,15	0,32 ^b ± 0,14
lc	9,42 ^a ± 6,60	5,93 ^b ± 7,31	8,03 ^c ± 6,32
paR	101,60 ^a ± 86,75	65,91 ^b ± 56,11	90,48 ^c ± 67,72
saR	-7,52 ^{a,b} ± 4,44	-6,84 ^a ± 4,01	-7,17 ^b ± 4,22
moR	0,10 ^a ± 0,10	0,13 ^b ± 0,14	0,11 ^a ± 0,11
doR	0,049 ^{a,b} ± 0,04	0,046 ^a ± 0,04	0,052 ^b ± 0,04
redR	-0,21 ^a ± 0,31	-0,28 ^b ± 0,35	-0,20 ^a ± 0,30
Entropia	1,57 ^a ± 0,25	1,35 ^b ± 0,17	1,47 ^{a,b} ± 0,22

Letras diferentes em uma mesma linha referem à diferença estatística entre os tumores

Para cada análise de discriminante foram obtidas uma ou duas funções canônicas. Os coeficientes canônicos de cada uma das funções estão demonstrados na Tabela 3

Tabela 3: Coeficientes canônicos das funções discriminantes:

Medidas	3M3T		TM3T		TM2T
	Função canônica 1	Função canônica 2	Função canônica 1	Função canônica 2	Função canônica 1
a	-0,0006	-0,0004	-0,0005	-0,0013	-0,0003
p	-0,023	0,015	-0,026	-0,010	-0,039
e	-3,442	-15,48	0,12	0,282	-11,764
l			-0,058	-0,103	0,208
c			-6,04	-17,686	-0,0938
l/c			-1,159	-11,209	-15,523
nR			0,0002	0,001	0,267
aR			0,0073	-0,006	0,0003
pR			0,553	-0,177	0,003
dpR			-0,01	-0,046	0,030
dmR			1,223	3,234	-0,038
apR			-0,025	0,057	2,960
amR			-0,568	-1,445	-0,125
lc			-0,011	-0,032	0,018
paR			-0,015	0,008	-0,050
saR			-0,051	-0,071	-0,079
moR			-2,086	2,414	0,036
doR			-1,366	5,533	3,263
redR			0,087	1,407	1,039

Tabela 4: Estrutura canônica de cada função:

Medidas	3M3T		TM3T		TM 2T
	Função canônica 1	Função canônica 2	Função canônica 1	Função canônica 2	Função canônica 1
a	-0,97	0,20	-0,76	0,01	-0,41
p	-0,98	0,21	-0,76	0,02	-0,42
e	-0,10	-0,99	-0,06	-0,42	-0,17
l			-0,61	0,22	-0,28
c			-0,74	-0,16	-0,47
l/c			0,06	0,41	0,16
nR			-0,21	0,17	-0,20
aR			0,24	-0,29	0,13
pR			0,28	-0,36	0,12
dpR			-0,42	-0,08	-0,92
dmR			-0,56	0,19	-0,56
apR			0,22	0,62	0,39
amR			0,16	0,15	0,16
lc			-0,50	0,16	-0,46
paR			-0,48	0,25	-0,31
saR			0,16	-0,01	0,37
moR			0,18	-0,15	-0,15
doR			-0,06	0,26	0,26
redR			-0,20	0,30	0,30

A Tabela 4 mostra a estrutura canônica que é composta pelos coeficientes de correlação entre a variável canônica e cada variável utilizada na função discriminante.

Na Tabela 5 podemos observar o erro estimado para todos os casos de histiocitoma, mastocitoma e TVT, usando as medidas básicas (3M3T). A Figura 14 é a representação da distribuição dos núcleos analisados considerando as duas variáveis canônicas obtidas com as medidas básicas.

Tabela 5: Erro estimado na identificação do tipo de tumor utilizando-se as funções canônicas obtidas com as medidas básicas.

Tipo de tumor	% de núcleos classificados como Histiocitoma	% de núcleos classificados como Mastocitoma	% de núcleos classificados como TVT	Porcentagem de erro
Histiocitoma	53%	27,6%	19,4%	47%
Mastocitoma	22,26%	54,47%	23,27%	45%
TVT	34,6%	38,2%	27,2%	72%
Total				55%

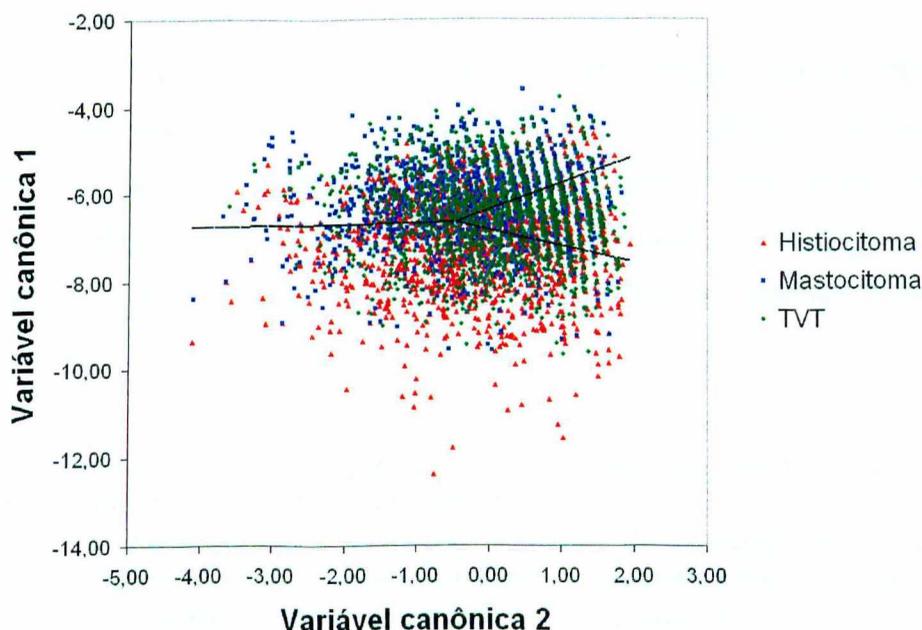


Figura 14: Visualização das variáveis canônicas de todos os núcleos de histiocitoma, mastocitoma e TVT, considerando-se as medidas básicas.

Neste tipo de gráfico o ponto central das três retas (onde as três retas tem início) corresponde no eixo y à média da variável canônica 1 de todos os núcleos

analisados (casos de Histiocitoma, Mastocitoma e TVT) e no eixo x á média da variável canônica 2 de todos os núcleos analisados. Cada tipo de tumor tem um espaço correspondente no gráfico baseado nos valores de suas variáveis, ou seja, cada núcleo está representado no gráfico tendo como valor no eixo y sua variável canônica 1 e no eixo x sua variável canônica 2. Sendo assim os casos de Histiocitoma se localizam na região inferior do gráfico, os casos de Mastocitoma na região superior esquerda e os casos de TVT na região direita (entre as duas retas diagonais). Para criar as retas de separação entre os tipos de tumores, calcula-se a média das variáveis canônicas 1 de um tipo de tumor (sendo este o valor de da coordenada y do ponto) e a média das variáveis canônicas 2 deste tumor (eixo x); plota-se este ponto e liga-se este ao ponto central calculado com base em todos os núcleos analisados, formando assim uma reta. Por exemplo: para calcular o ponto de separação entre os casos de Histiocitoma e de Mastocitoma, faz-se a média dos valores da variável canônica 1 dos núcleos que compõem estes grupos e faz-se o mesmo com a variável canônica 2; plota-se este ponto e ligando este ponto ao ponto central das três retas obtém-se então a reta de separação entre estes tumores (reta horizontal à esquerda do gráfico)

Na tentativa de melhor diferenciar os tipos de tumores, foram utilizadas outras medidas mais elaboradas e já citadas em Material e Método. A Tabela 6 mostra o erro estimado na identificação de histiocitoma, mastocitoma e TVT utilizando-se as funções canônicas obtidas com todas as medidas (TM3T). A Figura 15 é a representação da distribuição dos núcleos analisados considerando as duas variáveis canônicas obtidas com todas as medidas.

Tabela 6: Erro estimado na identificação do tipo de tumor utilizando-se as funções canônicas obtidas com todas as medidas

Tipo de tumor	% de núcleos classificados como Histiocitoma	% de núcleos classificados como Mastocitoma	% de núcleos classificados como TVT	Porcentagem de erro
Histiocitoma	54,53%	21,8%	23,67%	45%
Mastocitoma	17,8%	55,13%	27,07%	44%
TVT	28,33%	30,2%	41,47%	58%
Total				49%

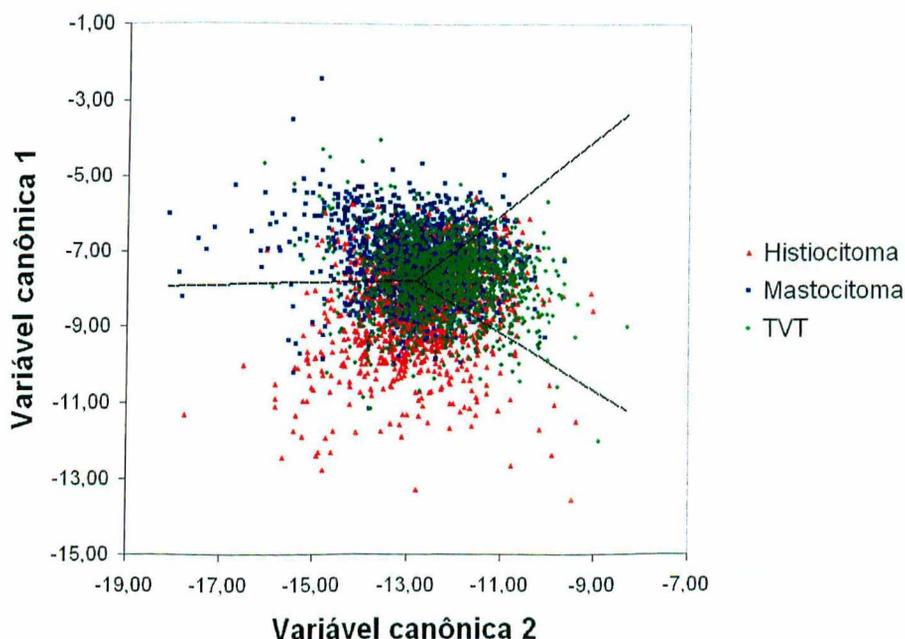


Figura 15: Visualização das variáveis canônicas dos núcleos de histiocitoma, mastocitoma e TVT, considerando-se todas as medidas.

Como a diferenciação obtida em todas as análises realizadas utilizando os três tipos de tumores em questão não foi ideal e tentando melhor diferenciar os casos de histiocitoma e TVT, que são os de maior dificuldade na diferenciação na histopatologia tradicional quando em locais ectópicos, foi realizada a análise de discriminante canônica excluindo os casos de mastocitomas.

Na Tabela 7 pode-se verificar o erro estimado para identificação dos núcleos de histiocitoma e TVT utilizando-se a função discriminante criada a partir de todas as medidas (TM2T). A Figura 16 é a representação da distribuição dos núcleos de histiocitoma e TVT considerando a variável canônica obtida com todas as medidas destes tumores.

Tabela 7: Erro estimado na identificação de TVT e histiocitoma utilizando-se a função discriminante obtida com todas as medidas.

Tipo de tumor	% de núcleos classificados como Histiocitoma	% de núcleos classificados como TVT	Porcentagem de erro
Histiocitoma	62,6%	37,4%	37%
TVT	33,33%	66,67%	33%
Total			35%

É importante ressaltar que para todas as situações analisadas, o erro estimado na “cross-validation” foi semelhante ao erro a priori.

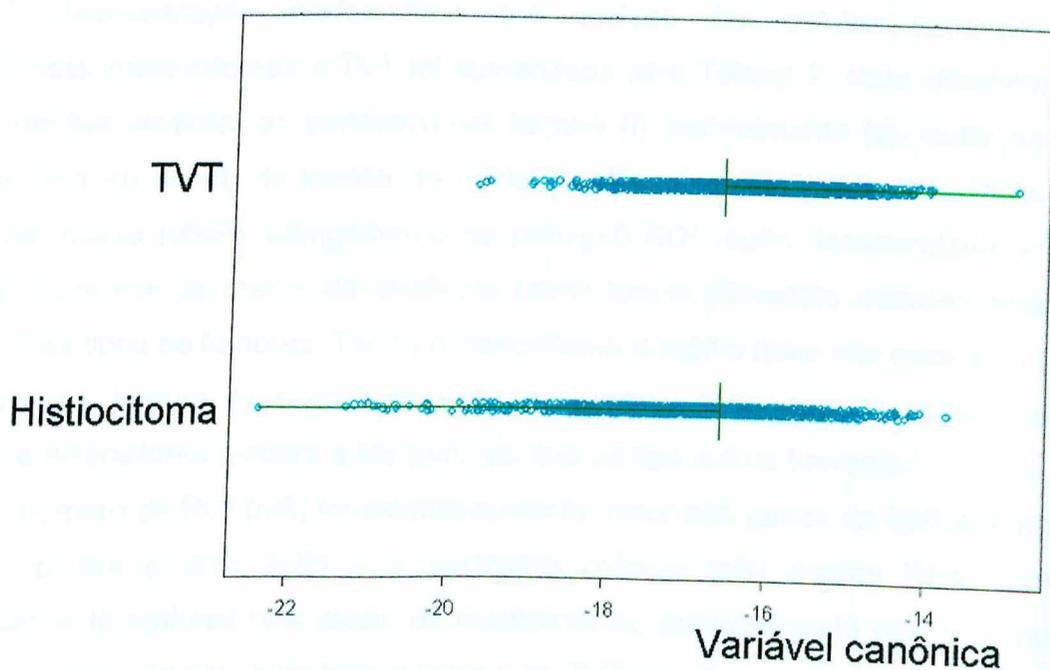


Figura 16: Visualização das variáveis canônicas dos núcleos de histiocitoma e TVT, considerando-se todas as medidas.

V. DISCUSSÃO

A caracterização morfométrica dos núcleos das células tumorais de histiocitomas, mastocitomas e TVT foi sumarizada pela Tabela 2. Nela observamos que as médias de área (a), perímetro (p), largura (l), comprimento (c), distância do principal ROI ao centro da massa do núcleo (dpR), distância média dos ROIs ao centro da massa (dmR), alongamento do principal ROI (apR), lacunaridade (lc) e primeiro autovalor da matriz de distância (paR) foram diferentes estatisticamente entre os três tipos de tumores. Tendo o histiocitoma a média mais alta para área (a), perímetro (p), largura (l) e comprimento (c) demonstrando que os núcleos das células de histiocitoma tendem a ser maiores que os dos outros tumores.

O número de ROI (nR) foi estatisticamente maior nos casos de histiocitoma e de TVT, porém a área (aR) e o perímetro médios (pR) destes ROIs foram estatisticamente maiores nos casos de mastocitoma, demonstrando que o número de ROIs é maior nos casos de histiocitoma e de TVT e estes são maiores em área e perímetro nos casos de mastocitoma. A média da razão de ocupação dos ROIs (moR) foi maior para mastocitoma, demonstrando que a proporção de heterocromatina e eucromatina é maior neste tipo de tumor. Ainda sobre a área dos ROIs (aR) é interessante verificar que em todos os casos estudados, o desvio padrão foi superior à média, mostrando uma grande variação nas áreas de ROIs (aR). Para os casos de mastocitoma isto é ainda mais evidente, demonstrando grande pleomorfismo na cromatina deste tumor. Sendo os valores da distância do principal ROI ao centro de massa (dpR) e da distância média de todos os ROIs ao centro de massa (dmR) maiores nos casos de histiocitoma e de TVT podemos verificar que a heterocromatina e o nucléolo estão distribuídos mais periféricamente no núcleo nestes tipos de tumores comparado ao mastocitoma. Podemos verificar também que há uma maior distância entre o centro de massa de cada ROI nos casos de histiocitoma e de TVT, pois os autovalores da matriz de distância (paR e saR) foram maiores para estes tumores. A média da lacunaridade (lc) foi estatisticamente superior nos casos de histiocitoma, o que demonstra uma maior heterogeneidade na distribuição dos ROIs. Entretanto, o maior valor de desvio

padrão para a lacunaridade (lc) foi para o mastocitoma, demonstrando que este tumor não mantém um padrão de distribuição da heterocromatina de um caso para outro.

Como a área (aR) e perímetro médios (pR) dos núcleos são significativamente diferentes em cada tumor, poderia ser sugerido o uso somente destas características como critério para auxiliar o diagnóstico diferencial destes tumores. Já a elipsidade (e) foi semelhante nos casos de histiocitoma e mastocitoma e menor nos casos de TVT. Essas características, são freqüentemente utilizadas em estudos morfométricos de tumores (BAAK *et al.* 1985; GHALI *et al.* 1992; HAMILTON & ALLEN, 1995; COHEN, 1996; MINKUS *et al.* 1997).

Com o intuito de potencializar o uso destas medidas na identificação destes tipos de tumor, foi realizada a análise de discriminante canônica, gerando-se duas funções discriminantes, definidas pelos coeficientes canônicos da situação 3M3T da Tabela 3. Entretanto, observando a Tabela 5 e a Figura 14 verifica-se que o erro estimado é muito grande, demonstrando a pouca eficiência do simples uso destas características como ferramenta de auxílio no diagnóstico diferencial destes tumores.

Na análise de discriminante canônica assume-se que os dados são homeocedásticos, ou seja, que suas matrizes de covariância são homogêneas. No presente trabalho não ocorre homoscedasticidade, contudo, segundo Tabachnick e Fidell (2001) este fato não invalida, mas há um enfraquecimento da análise. Freqüentemente, as condições ideais para a aplicação de métodos estatísticos não são conseguidas, porém, desde que sejam conhecidas as limitações dos resultados obtidos nestas condições, é aceitável a ruptura destas premissas quando são obtidos resultados relevantes.

Na tentativa de se obter melhores resultados no uso da citomorfometria no diagnóstico de histiocitoma, mastocitoma e TVT, foram propostas outras medidas para a caracterização morfométrica do núcleo das células tumorais, as quais levam em consideração a forma do núcleo e a textura da cromatina (TM3T). Assim, é possível observar na Tabela 6 e Figura 15 que o erro para cada tipo de tumor diminuiu, diminuindo assim o erro total.

É importante salientar que quando foram utilizadas somente as medidas básicas, as células de TVT eram identificadas em sua maioria como células de

outros tumores, inviabilizando o uso destas medidas no diagnóstico diferencial destes tumores. Com a implementação das novas medidas no geral todos os tumores passaram a ter a maioria das células identificadas corretamente. Contudo, os erros estimados permanecem relativamente altos, sugerindo que tal metodologia seja usada somente como auxiliar no diagnóstico.

A dificuldade de se identificar corretamente estes tumores poderia ser devido aos vários graus de pleomorfismo encontrados em cada caso de mastocitoma, dependendo do grau de malignidade (FOX, 1998; GRAHAN & O'KEEFEN, 1998 e MULLER *et al.* 2001). Contudo, o mastocitoma foi o tipo de tumor com menor entropia, ou seja, com menor pleomorfismo. Isso sugere que provavelmente os casos de mastocitomas utilizados neste experimento eram de pouca malignidade. Nesse estudo, os mastocitomas não foram pré-classificados pelo grau de pleomorfismo, ou seja, de malignidade. A dificuldade encontrada na identificação de mastocitomas através da morfometria dos núcleos das células neoplásicas é compensada no diagnóstico histopatológico pelas características citoplasmáticas dessas células e pelo conteúdo encontrado entre elas, tal como presença intensa de eosinófilos e feixes de fibras colágenas (Figura 2) (BOSTOCK & OWEN, 1975; MULLER *et al.* 2001).

A importância de cada medida na formação das funções canônicas pode ser verificada na Tabela 4. Nela percebe-se que geralmente quando uma medida influencia muito uma função, ela pouco pesa na outra função. Isto acontece com as medidas que melhor separam os tipos de tumores, tais como área (a), perímetro (p), comprimento (c), distância do centro de massa do maior ROI ao centro de massa do núcleo (dpR), distância média dos centros de massa dos ROIs ao centro de massa do núcleo (dmR) e lacunaridade (lc). As medidas de pouca importância em ambas funções, tais como segundo autovalor da matriz de distância (saR), alongamento médio dos ROIs (amR), desvio padrão da razão de ocupação dos ROIs (doR), média da razão de ocupação dos ROIs (moR) e número de ROIs (nR), não são eficientes para separar os tipos de tumores.

Na prática a maior dificuldade é o diagnóstico diferencial entre histiocitoma e TVT, principalmente quando estes últimos são ectópicos. Esta dificuldade é devido a grande semelhança morfológica destes tumores, provavelmente por ambos serem

originados de histiócitos (MOZOS *et al.* 1996 e VARASCHIN *et al.* 2001). Por esta razão foi realizada análise de discriminante utilizando-se somente estes tumores. Vemos na Tabela 7 e Figura 16 que o erro estimado neste caso é em torno de 35%. Isto significa que aproximadamente 65% das células de cada caso seriam corretamente classificadas, fazendo com que tenhamos um alto índice de acerto no diagnóstico destes tumores quando utilizamos esta metodologia.

Podemos observar que mesmo que o TVT e o histiocitoma tenham a mesma origem, a média para área (a), perímetro (p), elipsidade (e), largura (l), comprimento (c), razão da largura pelo comprimento (l/c), área média dos ROIs (aR), perímetro médio dos ROIs (pR), distância do centro de massa do principal ROI ao centro de massa do núcleo (dpR), distância média do centro de massa dos ROIs ao centro de massa do núcleo (dmR), alongamento do principal ROI (apR), alongamento médio dos ROIs (amR), lacunaridade (lc) e autovalores da matriz de distância maior (paR) foram estatisticamente diferentes entre estes dois tumores.

Pode-se verificar na Tabela 4 (TM2T), que as medidas que melhor separam TVT e histiocitoma são distância do centro de massa do principal ROI ao centro de massa do núcleo (dpR), distância média do centro de massa dos ROIs ao centro de massa do núcleo (dmR), comprimento (c), lacunaridade (lc), perímetro (p) e área (a) ou seja, são as mesmas medidas que melhor separam os três tipos de tumores, porém com outra ordem. Portanto, além do tamanho do núcleo, a localização e distribuição da heterocromatina e do nucléolo são características importantes na caracterização dos núcleos das células destes tumores, mostrando-se boas como critério de identificação destas células.

VI. CONCLUSÃO

As médias para área (a), perímetro (p), largura (l), comprimento (c), distância do maior ROI ao centro de massa do núcleo (dpR), distância média dos ROIs ao centro de massa (dmR), alongamento do principal ROI (apR), lacunaridade (lc) e primeiro autovalor da matriz de distância (paR) foram diferentes estatisticamente para os três tipos de tumores.

Na formação das funções canônicas as medidas que melhor separam os três tipos de tumores foram área (a), perímetro (p), comprimento (c), distância do centro de massa do maior ROI ao centro de massa do núcleo (dpR), distância médias dos centros de massa dos ROIs aos centros de massa do núcleo (dmR) e lacunaridade (lc).

A morfometria dos núcleos das células neoplásicas envolvendo medidas geométricas e caracterização da textura da cromatina é uma promissora ferramenta no diagnóstico diferencial de histiocitoma e TVT.

Para diagnóstico diferencial de histiocitoma, TVT e mastocitoma esta metodologia pode ser utilizada como ferramenta auxiliar, sempre acompanhada por outros métodos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANESE, F.; POLI, A.; MILLANTA, F.; ABRAMO, F. Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumor with *Leishmania*- laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin? **Veterinary Dermatology**, Oxford v.13, p.243-246, 2002.
- BAAK, J. P. A.; DOP, H. V.; KURVER, P. H. J.; HERMANS, J. The value os morphometry to classic prognosticators in breast cancer. **Cancer**, New York; v.56, n.15, p.374-382, 1985.
- BENDER, W. M.; MULLER, G. H. Multiple, resolving, cutaneous histiocytoma in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago; v.194, n.4, p.535-537, 1989.
- BOSTOCK, D. E.; OWEN, L. N. **Neoplasia in the cat, dog and horse**. Holland: Smeets-Weert, 1975. 144p.
- BROWN, N. O.; CALVERT, C.; MacEWEN, G. Chemotherapeutic management of transmissible venereal tumors in 30 dogs. **Journal the American Medical Association**, Chicago; v.15, n. 10, p.983-986, 1980.
- CALDERWOOD MAYS, M. B.; BERGERON, L. A. Cutaneous histiocytosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago; v.188, n.4, p.377-381, 1986.
- COHEN, C. Image cytometric analysis in pathology. **Human Pathology**, Philadelphia, v.27, n.5, p.482-493, 1996.
- CONROY, J. D. Canine skin tumor. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 19, p.91-114, 1983.

COSTA, L. F. Multidirecional scale-space shape analysis. In: INTERNATIONAL WORKSHOP OF SYNTHETIC-NATURAL HIBRID CODING AND THREE DIMENSIONAL IMAGINING, 1., 1999, Santorini, Anais: **Proceeding**, Santorini: M. Strinzis p. 214-217.

COSTA, L. F., CESAR, Jr. R. M. **Shape analysis and classification-theory and practice**. CRC Press: Boca Raton; 2001.

DeNICOLE, D.; REAGAN, W. J. Using cytology in the diagnosis of cancer. In: MORRISON, W. B. **Cancer in dogs and cats-medical and surgical management**. 2. ed. Lippicott: Willinas & Wilkins, 1998. p.79-94.

EINSTEIN, A. J.; WU, H.; SANCHEZ, M.; GIL, J. Fractal characterization of chromatin appearance for diagnosis in breast cytology. **Journal of pathology**. London, v. 185, p.366-381, 1998.

FOX, L. E. Mast cell tumors. In: MORRISON, W. B. **Cancer in dogs and cats-medical and surgical management**. 2. ed. Lippicott: Willinas & Wilkins, 1998. p.477-505.

GHALI, S. V.; LIAU, S.; TEPLITZ, C.; PRUDENTE, C. A comparative study of DNA ploidy in 115 fresh-frozen breast carcinomas by image analysis versus flow cytometry. **Cancer**, New York, v.70, n.11, p.2668-2672, 1992.

GRAHAN, J. C.; O' KEEFEN, D. A. Sarcomas de tecido mole e mastocitomas. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders - clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. p.226-245.

GONZALEZ, C. M.; GRIFFEY, S. M.; NAYDAN, D. K.; FLORES, E.; CEPEDA, C. G.; MADEWELL, B. R. Canine transmissible venereal tumor: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumors in growth phase and during regression after chemotherapy. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v.122, p.241-248,

2000.

HAHN, K. A. Chromosomal changes associated with cancer. In: MORRISON, W. B. **Cancer in dogs and cats-medical and surgical management**. 2. ed. Lippincott: Willinas & Wilkins, 1998. p.55-57.

HAMILTON, P. W.; ALLEN, D. C. Morphometry in histopathology. **Journal of Pathology**, London, v.175, p.369-379, 1995.

HARMELIN, A.; ZUCCKERMAN, A.; NYSKA, A. Correlation of Ag – NOR protein measurements with prognosis in canine transmissible venereal tumors. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v.112, p.429-33, 1995.

MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLANSKI, C.; RIGAL, D.; MAGNOL, J. P. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.57, n. 1-2, p.1-11, 1997.

MARTIN DE LAS MULAS, J.; MILLAN, Y.; RUIZ-VILLAMOR, E.; BAUTISTA, M. J.; ROLLON, E.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A. Apoptosis and mitosis in tumors of the skin and subcutaneous tissues of the dog. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v.66, p.139-146, 1999.

MAYR, B.; REIFINGER, M.; BREM, G.; FEIL, C.; SCHLEGER, W. Cytogenetic, ras, and p53: Studies in cases of canine neoplasms (Hemangiopericytoma, Mastocytoma, Histiocytoma, Chloroma). **Journal of Hereditary**, Baltimore, v.90, n.1, p-124-28, 1999.

MINKUS, G.; JUTTING, U.; AUBELE, M.; RODENACKER, K.; GAIS, P.; BREUER, W.; HERMANN, W. Canine neuroendocrine tumors of the pancreas: a study using image analysis techniques for the discrimination of metastatic versus nonmetastatic tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v.34, p.138-145, 1997.

MORRIS, J. S.; BOSTOCK, D. E.; MCINNES, E. F.; HOATHER, T. M.; DOBSON, J. M. Histopathological survey of neoplasm's in flat-coated retrievers, 1990 to 1998. **Veterinary Record**, London, v. 9, p. 291-294. Sept, 2000.

MOULTON, J. E. **Tumors is domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California. 1990. 672p.

MOZOS, E.; MÉNDEZ, A.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; PÉREZ, J. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Pathology**, New York, v. 33, n. 3, p.257-63, 1996.

MULLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Dermatologia dos pequenos animais**. 5. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001.1520 p.

NAGATA, M.; HIRATA, M.; ISHIDA, T.; HIRATA, S.; NANKOS, H. Progressive Langerhans' cell histiocytosis in a puppy. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.11, p.241-246, 2000.

PATNAIK, K. A. K.; EHLER, W. J.; MacEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor; morphological grading and survival time in 83 dogs **Veterinary Pathology**, New York, v. 21, p.469-74, 1984.

PÉREZ, J.; DAY, M. J.; MOZOS, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumor at different stages of growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p.133-47, 1998.

PIENTA, K. J.; COFFEY, D. S. Correlation of nuclear morphometry with progression of breast cancer. **Cancer**, New York, v. 68, n.1, p.2012-2016, 1991.

- QUEIROZ, R. P. Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo em tumor de células basais, carcinoma de células escamosas e histiocitoma de cães utilizando impregnação pela prata (coloração de AgNOR). Belo Horizonte, 1996.56 p. Tese mestrado em Patologia. Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.
- ROGERS, K. S. Common questions about diagnosing and treating canine mast cell tumors. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v.88, n.3, Mar, p.246-250, 1993.
- ROGERS, K. S. Mast cell tumor-Dilemmas of diagnosis and treatment. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.26, n.1, p.87-102, 1996.
- ROGERS, K. S.; WALKER, M. A.; DILLON, H. B. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **Journal of the American Hospital Association**, Lakewood, v.34, p.463-470, 1998.
- SCHERLIE, P. L.; SMEDES, S. L.; FELTZ, T.; DOUGHERTY, S. A.; RIIS, R. C. Ocular manifestation of systemic histiocytosis in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Lakewood, v.201, n.8, 1992.
- SHAN, G.; SHUFAN, L.; ZIHUA, S.; LONGXIANG, P. Morfometric analysis of spinous cell in oral submucous fibrosis—comparison with normal mucosa, leukoplakia and squamous cell carcinoma. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v.108, n.5, p.351-354, 1995.
- SIMÕES, J. P. C.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology**, New York, v.31, p.637-647, 1994.
- STREFEZZI, R. D. F.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Morphometry of canine mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, New York, v.40, p. 268-275, 2003.

TABACHNICK, B. G.; FIDELL, L. S. **Using multivariate statistics**. 4.ed. Boston: Allyn and Bacon, 2001. 966p.

VARASCHIN, M. S.; WOUTERS, F.; BERNIS, V. M. O.; SOARES, T. M. P.; TOKURA, V. N.; DIAS, M. P. L. L. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentação clínico-patológicas. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.32, p.32-38, 2001.

WILLEMSE, T. **Dermatologia clínica de cães e gatos**. 2. ed. São Paulo: Manole. 1998. 143p.