

**Valdiana Araújo Leal**

MUN  
515.222.57:636.5  
0.435 m  
T/M/10/03

**SISBI/UFU**



1000215497

**MORFOMETRIA DE NÚCLEOS DE CÉLULAS TUMORAIS NO DIAGNÓSTICO  
DIFERENCIAL DA DOENÇA DE MAREK E LEUCOSE LINFÓIDE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Área de concentração:** Clínica e Cirurgia

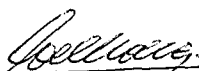
**Orientador:** Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho

**Coorientador:** Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia – MG  
2003

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

Dissertação defendida e aprovada em 6 de fevereiro de 2003, pela comissão examinadora constituída por:



---

Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho  
**Orientador**



---

Prof. Dr. Luciano da Fontoura Costa



---

Prof. Dr. Marcos Silva



---

Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva  
Coordenador do Programa de Pós - Graduação em Ciências Veterinárias

A meus pais **VALDA** e **EDSON**,

Quantas vezes tu foste paciência, tu foste acalento!

Hoje eu gostaria que tu vibraste comigo.

Não porque eu venci, mas porque juntos vencemos mais um desafio em nossas vidas.

E que diante dos próximos.

Deus permita estarmos juntos, para mais forte podermos enfrentá-los.

“...A tua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, eu sinto que em meu gesto existe o teu gesto, e em minha voz a tua voz”.

Ao meu noivo **RICARDO**, pelo estímulo,  
força, compreensão e principalmente por seu  
amor.

As minhas irmãs **EDVALDA**, **EDVÂNIA**, **JULIANA** e **FABIANA** , que sempre me deram incentivo e força para que eu pudesse continuar a minha jornada.

**DEDICO ESTE TRABALHO**

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que me deu o Dom da vida, me abençoou com a inteligência, e agora me proporciona a graça de alcançar um ponto sublime na minha história, minhas simples palavras não poderiam traduzir o que realmente sinto, por isso.....

A Ti honra de minha vitória!

Ao meu orientador e amigo **Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho**, por seus grandiosos ensinamentos desde a graduação, me incentivando e apoiando com sua imensa paciência e companheirismo.

Ao meu Coorientador e amigo **Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti**, por sua imensa dedicação. Este trabalho não teria sido possível sem a sua presença e incentivo.

**Muito Obrigado!!!!**

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos professores **Renato Souto Severino** e **Frederico Ozanam** pelo constante apoio durante o curso.

Ao técnico de laboratório **Rui Silva**, pela dedicação e paciência despendida durante o processamento dos materiais histopatológicos.

Aos amigos e colegas de Pós- Graduação **Eduardo Maurício** e **Danila Barreiro**, pela amizade e companhêrismo.

A **Fernanda Borges Neto**, secretária da revista Veterinária Notícias, e a **Marcos Antônio de Oliveira**, secretário do Programa de Pós-graduação, pelo auxílio e boa vontade nos momentos precisos.

A **Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro, permitindo com isso a realização do curso, o desenvolvimento deste trabalho e dos demais projetos de pesquisa, realizados nos últimos dois anos.

Aos colegas da Pós- Graduação pela excelente convivência, amizade e ajuda oferecida.

E a todos que colaboraram para a realização deste trabalho, os mais sinceros reconhecimentos.

## SUMÁRIO

1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
2. LISTA DE FIGURAS.....	ii
3. LISTAS DE TABELAS.....	iv
3. RESUMO.....	v
4. ABSTRACT.....	vi
5. INTRODUÇÃO.....	1
6. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
8. RESULTADOS.....	9
9. DISCUSSÃO.....	16
10. CONCLUSÃO.....	19
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
12. NORMAS ADOTADAS.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

DM	doença de Marek
LL	Leucose Linfóide
VDM	vírus da doença de Marek
VLL	vírus da Leucose Linfóide
HE	hematoxilina eosina
μm	micrômetro

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Corte histológico das lesões de DM no fígado (A) e baço (B) de *Gallus gallus*, verificando-se a proliferação dos linfócitos neoplásicos e pleomórficos (seta) no parênquima – Figura 1A - 7200X;  
Figura 1B - 1200X----- 07
- Figura 2- Corte histológico das lesões de LL no fígado (A) e baço (B) de *Gallus gallus*, verificando-se a uniformidade da proliferação dos linfócitos neoplásicos (seta) no parênquima – 1200X----- 08
- Figura 3. Visualização tridimensional dos núcleos mensurados nos fragmentos de fígado de *Gallus gallus*, nas distintas neoplasias.----- 12
- Figura 4. Visualização tridimensional dos núcleos mensurados nos fragmentos de baço de *Gallus gallus*, nas distintas neoplasias.----- 12
- Figura 5. Visualização tridimensional dos núcleos mensurados nos fragmentos de baço (vermelho) e fígado (azul), de *Gallus gallus* na Leucose Linfóide.----- 13
- Figura 6. Visualização tridimensional dos núcleos mensurados nos fragmentos de baço (vermelho) e fígado (azul), de *Gallus gallus* na Doença de Marek.----- 13



Figura 7. Visualização bidimensional demonstrando a Variável Canônica nos fragmentos de baço de *Gallus gallus*, nas distintas neoplasias. Os pontos sob as linhas são os valores identificados corretamente em cada neoplasia.----- 14

Figura 8. Visualização bidimensional demonstrando a Variável Canônica nos fragmentos de Fígado de *Gallus gallus*, nas distintas neoplasias. Os pontos sob as linhas são os valores identificados corretamente em cada neoplasia.----- 14

Figura 9. Visualização bidimensional da variável Canônica nos fragmentos de fígado e baço de *Gallus gallus*, nas distintas neoplasias. Os pontos sob as linhas são os valores identificados corretamente em cada neoplasia.----- 15

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e Desvio Padrão da área, perímetro e esfericidade dos núcleos celulares do fígado e baço acometidos pela Leucose Linfóide e doença de Marek.----- 09

Tabela 2. Coeficiente e estrutura canônica da função discriminante no baço e fígado de *Gallus gallus*.----- 10

Tabela 3. Valor da variável Canônica utilizado para diagnóstico diferencial da doença de Marek (D.M) e Leucose Linfóide (L. L) nos fragmentos de fígado e baço de *Gallus gallus*.----- 10

Tabela 4. Erro estimado utilizando-se a função canônica para o diagnóstico diferencial da doença de Marek (D.M) e leucose linfóide (L. L) nos fragmentos de fígado e baço de *Gallus gallus*.----- 11

## RESUMO

A doença de Marek e leucose Linfóide são tumores linfóides aviários, causados por vírus, ocasionando grandes perdas econômicas na indústria avícola. Este trabalho teve como finalidade tornar o diagnóstico diferencial entre estas duas neoplasias mais objetivo e fácil com a utilização da morfometria computadorizada dos núcleos de células tumorais. Foram analisadas pela mensuração nuclear dez lâminas de cada neoplasia, sendo 50% baço e 50% fígado, confirmadamente positivas por exame histopatológico. Os parâmetros mensurados foram área, perímetro e esfericidade de 50 núcleos em cada lâmina analisada. A maior dispersão dos dados obtidos na doença de Marek, confirmou objetivamente o maior pleomorfismo das células dessa doença comparada à Leucose Linfóide. Os dados obtidos durante a mensuração foram submetidos à análise discriminante canônica, construindo-se funções discriminantes para diagnóstico no fígado, baço e ambos. As três funções mostraram-se eficazes na identificação das diferentes células tumorais, contudo quando o órgão utilizado foi o baço obteve-se maior eficácia. Da mesma forma a leucose linfóide é mais facilmente identificada.

**Palavras-chave:** tumor, doença de Marek, leucose aviária, leucose linfóide, aves.

## ABSTRACT

The Marek's disease and Lymphoid leucosis are neoplastic diseases that occur in poultry, caused by virus and characterized by histopathologic tumors in lymphoid tissue of several organs occasioning great economic loss in the poultry industry. The aim of the study was to improve the differential diagnosis between these two neoplasms by more objective, precise and quicker using computerized nuclear morphometric of neoplastic cells, which has been used with great success in prognostic, diagnosis and animals. Ten sections of each neoplasm were analyzed by nuclear measurements from which five of spleen and five of liver, established positive by histopathologic diagnosis. The measured parameters were area, perimeter and roundness of 50 nuclei per slide analyzed. The biggest dispersion of the obtained data in the Marek's disease objectively confirmed the biggest pleomorphism of this disease compared to the Lymphoid Leucosis. The obtained data during the measurement were submitted to a canonical discriminant analysis, building discriminant function for diagnosis in liver, spleen and both. The three functions showed to be effective in the identification of the different tumor cells, however but performance was obtained for spleen. In the same way the lymphoid leucosis is identified more easily.

Key Words: tumor, Marek's disease, Lymphoid Leucosis, avian leucosis, poultry

## INTRODUÇÃO

A doença de Marek (D.M) e Leucose Linfóide (L.L) são enfermidades neoplásicas de ocorrência em aves, causadas por herpesvírus e retrovírus, respectivamente, e caracterizadas por tumores nos tecidos linfóides de diversos órgãos (PAYNE; VENUGAPAL, 2000; BIGGS, 2001).

A D.M é transmitida horizontalmente enquanto a transmissão da L.L ocorre por via horizontal e vertical dentro de planteis (WEIGEND, et al. 2001).

O controle da doença de Marek é feito por vacinação juntamente com medidas de higiene (BIGGS, 2001; BORENSHTAIN; DAVIDSON, 2002), na Leucose Linfóide este é feito por medidas de biossegurança e resistência genética (WEIGEND, et al. 2001).

Os sinais clínicos destas neoplasias podem ser confundidos, assim como suas lesões, sendo necessário correlacioná-las histopatologicamente, possibilitando o diagnóstico diferencial (CALNEK; WITTER, 1991; CORAK, 1994; ZAVALA, 1996; BERCHIERI; MACARI, 2000).

O diagnóstico histopatológico diferencial destas enfermidades se baseia em parâmetros subjetivos como o linfoplopleomorfismos da Doença de Marek (BERCHIERI; MACARI, 2000) e da uniformidade celular na Leucose Linfóide, sendo critérios de baixa objetividade e reprodutibilidade, necessitando de experiência técnica para distinção.

Nos últimos anos, a mensuração computadorizada de núcleos tem sido utilizada com grande êxito no prognóstico, diagnóstico e graduação de diversos tumores (VICO; MAIOLINO, 1997; BACUS *et al.*, 1999; CARDUCCI, *et al.*, 1999; KANAMARU *et al.*, 2001, MONTIRONI *et al.*, 2000; SPYRIDONOS *et al.*, 2001; TAN *et al.*, 2001).

Economicamente, ocorrem grandes perdas na indústria avícola, decorrente da imunodepressão das aves atingidas nas diferentes idades (SLUIS, 1997; SILVA, 1999).

O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade da técnica de mensuração nuclear computadorizada no diagnóstico diferencial destas enfermidades, uma vez que não se encontra relatos desta técnica em tumores aviários.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Entre os tumores aviários de grande impacto econômico na avicultura, destaca-se a doença de Marek e a Leucose Linfóide que são caracterizadas por tumores linfóides em diversos órgãos. A Doença de Marek é causada por herpesvírus e caracterizada por infiltração de células linfóides pleomórficas nos nervos periféricos e órgãos viscerais, enquanto a Leucose Linfóide é causada por retrovírus e caracterizada por linfoproliferação em tecidos linfóides (PAYNE; VENUGOPAL, 2000; BÍGGS, 2001).

O VDM oncogênico da doença de Marek possui quatro tipos; suave, virulento, muito virulento e muito muito virulento, sendo disseminada pelos folículos epiteliais das penas das aves, produzindo alto número de cópias (BORENSHTAIN; DAVIDSON, 2002; VENUGOPAL, 2000).

O controle da doença de Marek é feito por vacinação juntamente com medidas de higiene, no entanto o vírus vem sofrendo mutações na sua estrutura molecular e assim aumentando sua oncogenicidade e resistência, dificultando o controle por vacinas (BIGGS, 2001; VENUGOPAL, 2000).

O VLL pertence ao subgrupos A e B da Leucose Linfóide Aviária, seu controle é feito por medidas de biossegurança e resistência genética de certas aves (WEIGEND et al., 2001).

Aydin et al.(1995), estudando estas doenças, constataram que estas causam tumores no fígado, baço, bolsa cloacal, coração e em especial nos órgãos linfóides primários e secundários. Corak (1994) e Zavala, (1996) observaram ainda nestes órgãos o aparecimento de linfomas múltiplos.

Nos últimos anos, a incorporação de sistemas computadorizados com digitalização de imagens tem permitido um desenvolvimento acelerado e inovador no estudo morfológico de diversas enfermidades proporcionando maior objetividade, reprodutibilidade (CARDUCCI, et al. 1999; MONTIRONI et al.,2000; KANAMARU et al.,2001).

Colombel et al.(1995); Fukuzawa et al. (1995); Ruiz et al.(1995); Dey et al.(2000); Roels et al.(2000); Milord et al.(2001) demonstraram em seus experimentos as vantagens da morfometria de núcleos sobre o diagnóstico histopatológico feito por microscopia óptica, demonstrando a sensibilidade desta em detectar mudanças macroscópicas.

Hamilton e Allen (1995); Ozaki e Kondo (1995) no estudo do diagnóstico diferencial de tumores neuroendócrino maligno de benigno, observaram que a morfometria de núcleos fornece, além da objetividade, outras vantagens, como a graduação e prognóstico do câncer de mama com alta reprodutibilidade. Minkus et al.(1997); Javala et al. (2001) estudando câncer ductal de mama invasivo, determinaram que a quantificação da atividade mitótica pôde ser aplicada na graduação deste e na seleção de pacientes para terapia adjuvante.

Ruiz et al.(1999); Dey et al.(2000); Tan et al.(2001) buscaram correlacionar graduação citológica visual com morfometria nuclear computadorizada de carcinoma de mama, verificando que a mensuração de vários parâmetros geométricos dos núcleos melhora o diagnóstico, tornando-o mais rápido e de fácil classificação. Kronqvist et al. (2000) salientaram que, além da graduação histológica do tumor, a mensuração pode fazer a diferenciação tubular do câncer de mama, sendo de grande relevância clínica.

Vico e Maiolino (1997) e Bacus et al. (1999), estudando carcinomas mamários em felinos, constataram a eficiência desta técnica no diagnóstico e prognóstico do tumor, melhorando o prognóstico visual com a graduação do pleomorfismo dos núcleos.

No estudo de câncer de bexiga, Colombel et al.(1995); Fukuzawa, et al. (1995); Spyridonos et al.(2001); Milord et al.(2000) observaram que a confiabilidade da morfometria dos núcleos na quantificação do potencial maligno do tumor torna o diagnóstico mais objetivo e de maior respaldo clínico.

Veltri et al.(2000); Ozer et al.(2001) avaliaram a importância da morfometria computadorizada em prever a conduta clínica no câncer de bexiga superficial, observando seu

valioso papel na determinação da atividade proliferativa e podendo ser correlacionada com o grau histológico no câncer superficial de bexiga. Todavia, esta técnica tem potencial para prever prognóstico para tumores de bexiga, próstata e carcinoma de células renais, melhorando o sistema de classificação dado pelo World Health Organization (CASTREN et al., 1995; NATIV et al., 1998; WOJCIK et al., 1998; KANAMARU et al., 2001).

Nos estudos de melanomas, Mauri, et al. (1997) constaram que a avaliação morfométrica dos contornos nucleares nos subgrupos de melanomas representam um prognóstico com significância estatística. Williams et al. (1999) verificaram a eficiência da técnica de morfometria dos núcleos quando comparada à técnica imunohistoquímica e DNA citometria de imagem na diferenciação de lesões malignas e benignas em melanoma na pele.

A avaliação histológica requer uma experiência do patologista para leitura diferencial das variáveis do prognóstico e diagnóstico, que para alguns são subjetivas, enquanto que na análise de imagem, estas se apresentam de forma objetiva (Roels et al., 2000).

Vico et al. (1997); Bacus et al. (1999); Roels et al. (2000) declararam que a maior desvantagem no prognóstico de tumores em animais é a carência de uma boa documentação de estudos anteriores, usando índice de sobrevivência como um critério objetivo para avaliação comportamental do tumor.

Gao et al (1995) observaram que o diagnóstico histopatológico de lesões orais pré-malignas são amplamente baseadas em avaliações subjetivas das anomalias morfológicas dentro do tecido lesionado. Assim, com o estudo do tamanho e o contorno das células e núcleos na camada espinhal do epitélio, constataram uma melhor diferenciação entre mucosa oral normal, leucoplasia, displasia e carcinoma bucal.

Vernau et al. (1998) juntamente com o Instituto Nacional do Câncer (NCI-WF) o qual determina a classificação morfológica de linfomas em humanos e animais, verificaram a aplicação



da morfometria na classificação de tumores linfóides, vindo a constatar o potencial de objetividade e reprodutibilidade da técnica.

Segundo Meijer et al.(1995) a avaliação objetiva da displasia do adenoma coloretal é possível com a combinação de morfometria de núcleos, estereologia, contagem mitótica e análise estrutural. Ikeguchi et al.(1999) estimaram que as características morfométricas do núcleo são mais objetivas e rápidas do que os parâmetros clinicopatológico em casos de adenocarcinoma.

Katsoulis et al. (1995); Liu et al. (1999) avaliaram que os parâmetros da morfometria dos núcleos são como suporte no diagnóstico e nas decisões terapêuticas, especialmente a presença de núcleos gigantes e células irregulares. Podendo ser úteis em prever resultados em pacientes em estágio inicial de adenocarcinoma de células ovarianas.

Kavantzias et al.(2000) verificaram a objetividade da morfometria de núcleos em diagnósticos diferenciais de câncer pulmonar, podendo ser usada para complementar a histopatologia.

Ikeguchi et al.(1998,1999) correlacionaram características morfonucleares e parâmetros clínicos de pacientes com câncer hepático e gástrico avançados, verificaram que as que células com maior área, possuíam alto potencial de invasão e metástase.

De acordo com McLachlan, 1992; Huberty, 1994; Ostermeier et al.2001 a análise discriminante pode ser usada para quantificar observações sobre indivíduos pertencentes a dois ou mais grupos; como pacientes infectados ou livres de uma determinada doença. A partir desta observações pode-se criar funções para esclarecimento individual, as quais são úteis para nomear observações adicionais ao grupo correto.

A mensuração ajuda a melhorar a interpretação das mudanças morfológicas e automaticamente permite grande número de amostras para análise rápida, removendo erros humanos e aumentando o processo de reprodutibilidade e objetividade nas decisões de diagnóstico (ALTENSTRASSER, et al., 1998)

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados fragmentos dos órgãos fígado e baço durante necropsias de aves (*Gallus gallus*) de diferentes idades e linhagens que apresentavam lesões sugestivas de Doença de Marek e Leucose Aviária.

As amostras foram fixadas em solução aquosa de formaldeído (LABSYNTH- Produtos para Laboratórios Ltda.) a 4%, recortadas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Em seguida, foram realizados cortes micrométricos com espessura de 5µm, coradas pela técnica de HE, segundo LUNA (1968). Após a confirmação pela microscopia óptica, selecionou-se dez lâminas de cada neoplásia, sendo cinco de baço (Figura.1A-B) e cinco de fígado (Fígado.2A-B). Foram mensurados 50 núcleos aleatoriamente em cada lâmina num aumento de 100X, os quais tiveram os parâmetros geométricos área, perímetro e esfericidade avaliados. As análises morfométricas foram realizadas através do programa HL Image 97<sup>++</sup> utilizando-se 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.

Para verificar se houve diferença nas mensurações nucleares entre as duas enfermidades, nos órgãos analisados, utilizou-se a análise discriminante canônica. Este procedimento foi realizado pelo programa estatístico S-PLUS 2000. Professional.

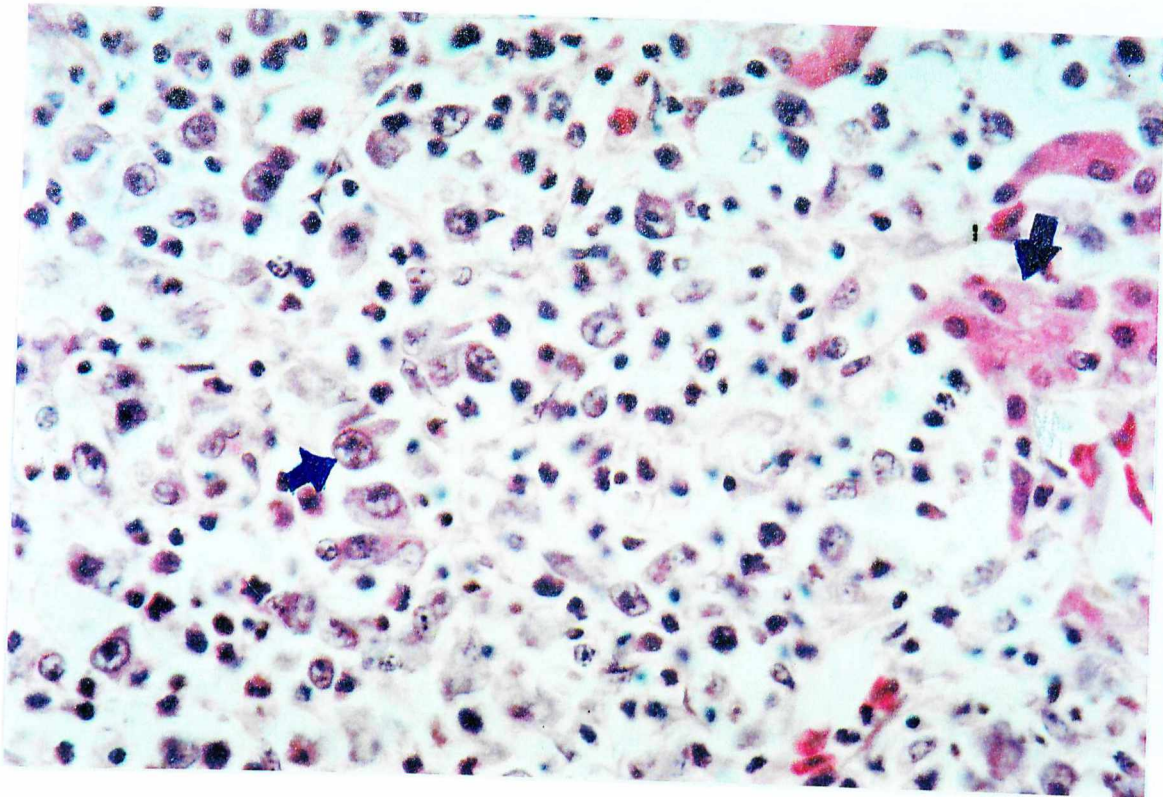
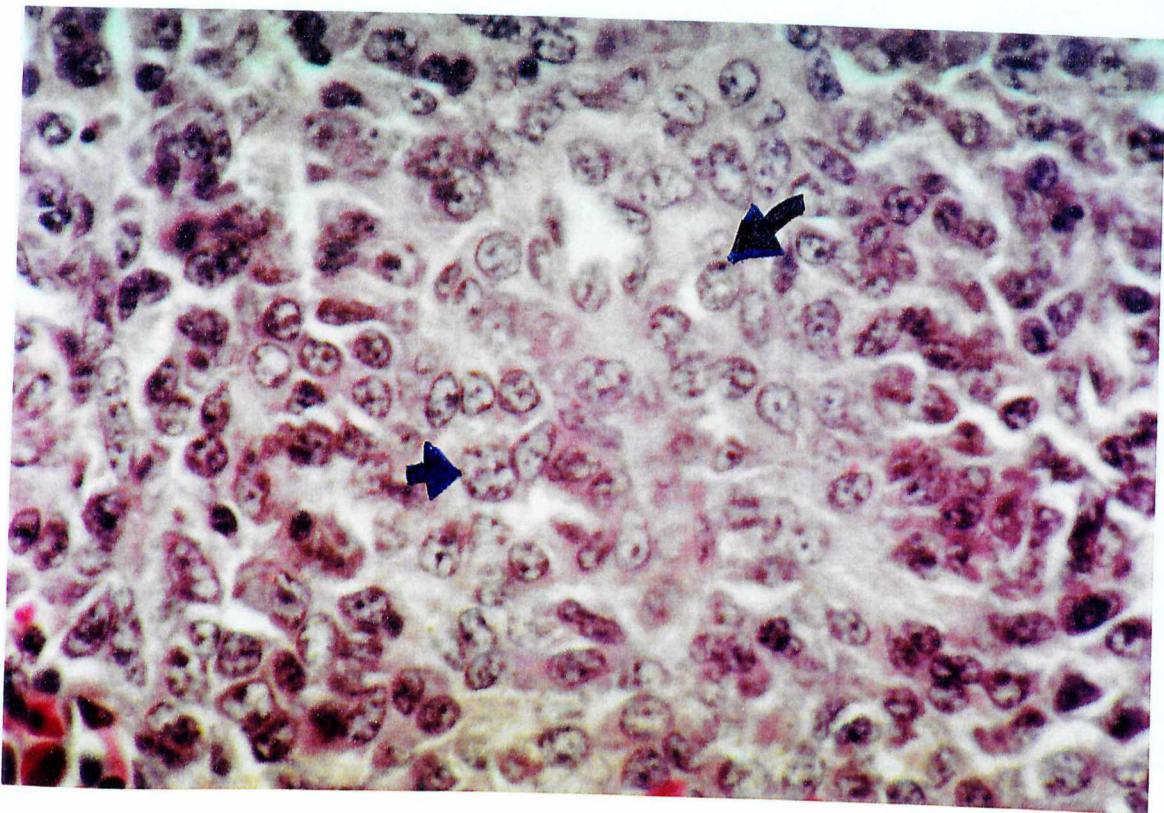
**A****B**

Figura 1- Corte histológico das lesões de DM no fígado (A) e baço (B) de *Gallus gallus*, verificando-se a proliferação dos linfócitos neoplásicos e pleomórficos (setas) nos parênquimas –  
Figura 1A - 7200X; Figura 1B - 1200X

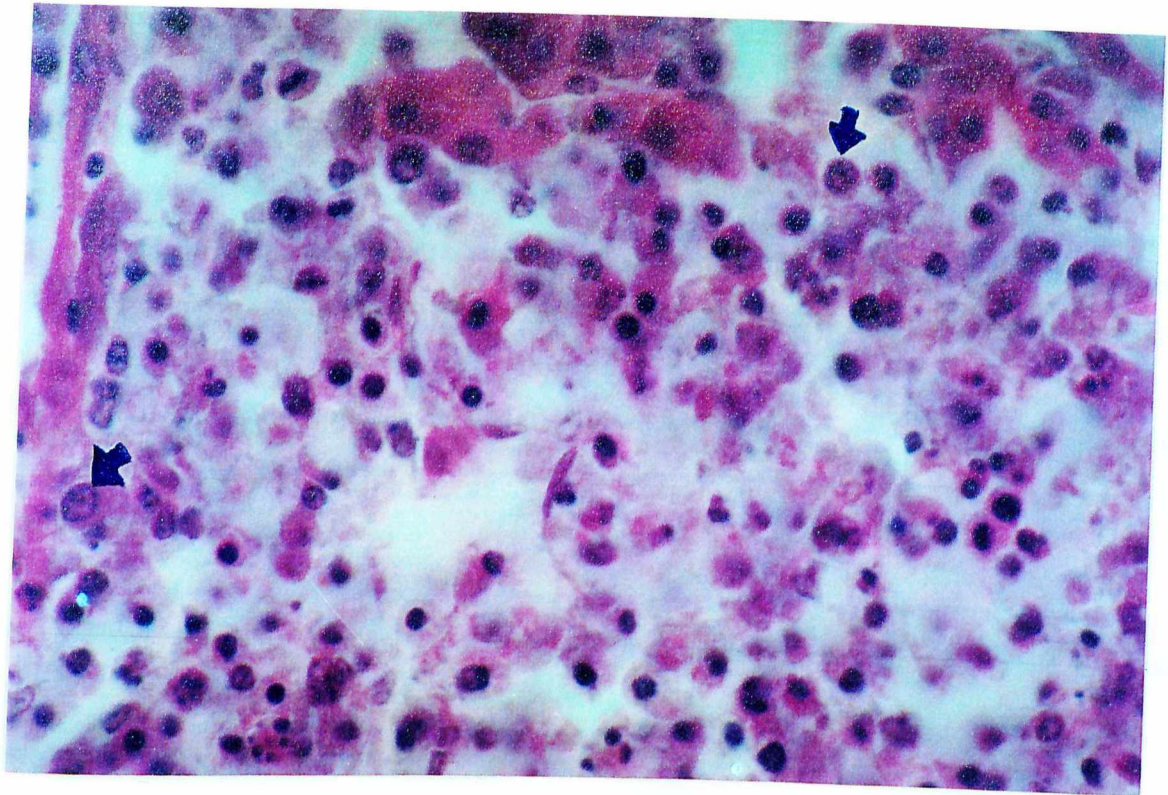
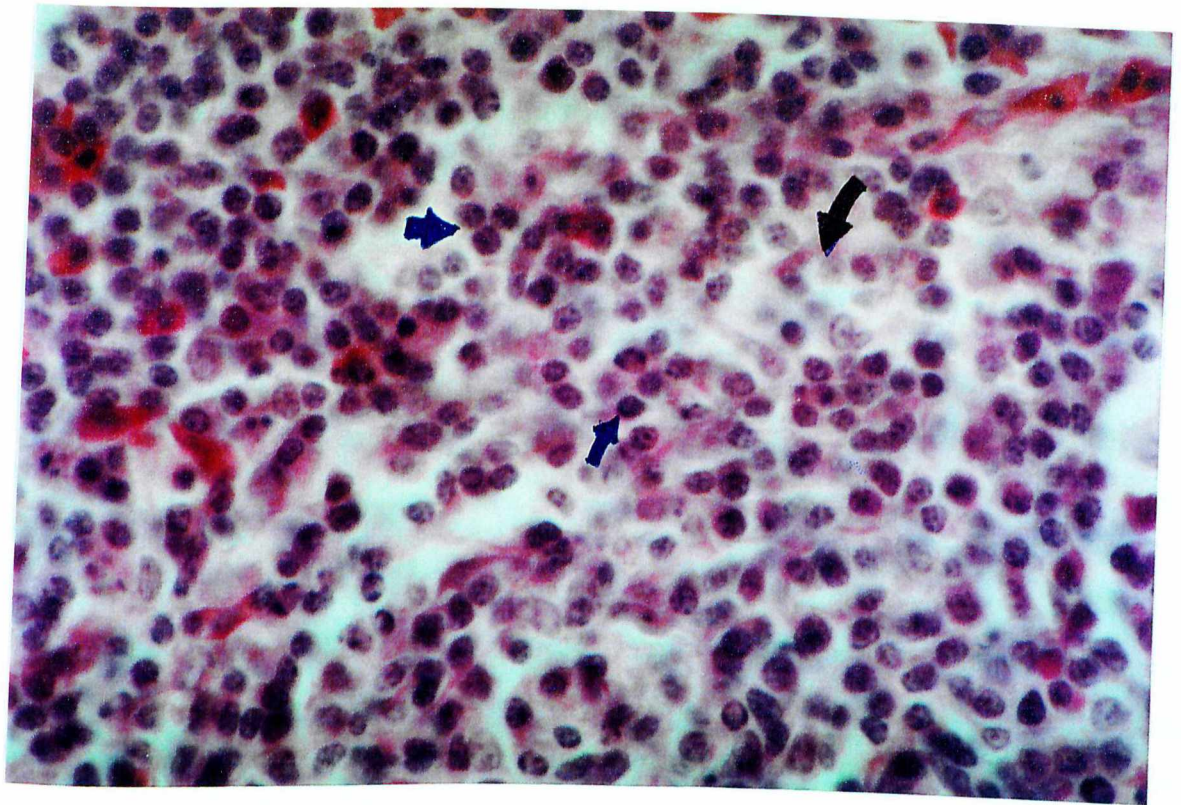
**A****B**

Figura 2- Corte histológico das lesões de LL no fígado (A) e baço (B) de *Gallus gallus*, verificando-se a uniformidade da proliferação dos linfócitos neoplásicos (setas) nos parênquimas – 1200 X.

## RESULTADOS

Na Tabela I estão demonstradas médias e desvio padrão das variáveis mensuradas, onde verifica-se que a Doença de Marek possui células maiores do que as acometidas pela Leucose Linfóide.

Na visualização tridimensional dos núcleos mensurados (Figura 3 e Figura 4) no fígado e baço das distintas neoplasias, observa-se que as células da Doença de Marek possuem uma distribuição mais dispersa quando comparada com as da leucose linfóide.

Tabela I, Médias e Desvio Padrão da área, perímetro e esfericidade dos núcleos celulares do fígado e baço acometidos pela Leucose Linfóide e doença de Marek.

Médias( $\bar{X}$ ) e desvios padrão(DP)			
Órgãos			
Analizados	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Esfericidade
Fígado Leucose	6,743 $\pm$ 4,017 <sup>a</sup>	9,914 $\pm$ 2,005 <sup>a</sup>	0,841 $\pm$ 0,061 <sup>a</sup>
Baço Leucose	5,522 $\pm$ 1,541 <sup>a</sup>	8,864 $\pm$ 1,128 <sup>a</sup>	0,869 $\pm$ 0,0337 <sup>a</sup>
Fígado/Baço Leucose	6,132 $\pm$ 1,983 <sup>a</sup>	9,389 $\pm$ 1,566 <sup>a</sup>	0,855 $\pm$ 0,054 <sup>a</sup>
Fígado Marek	10,160 $\pm$ 5,266 <sup>b</sup>	12,562 $\pm$ 3,431 <sup>b</sup>	0,765 $\pm$ 0,091 <sup>b</sup>
Baço Marek	11,628 $\pm$ 6,011 <sup>b</sup>	12,917 $\pm$ 3,364 <sup>b</sup>	0,823 $\pm$ 0,076 <sup>b</sup>
Fígado e Baço Marek	10,894 $\pm$ 5,772 <sup>b</sup>	12,740 $\pm$ 3,445 <sup>b</sup>	0,794 $\pm$ 0,088 <sup>b</sup>

Médias e Desvio Padrão seguidos de diferentes letras minúsculas, nas colunas, indicam que as neoplasias diferem entre si ( $p < 0,05$ )

As Figuras 5 e 6 demonstraram os núcleos mensurados nos fragmentos de baço e fígado na Doença de Marek e Leucose Linfóide. Os núcleos mensurados nas células do baço e fígado acometidos por Doença de Marek tiveram suas distribuições dispersas. Na Leucose Linfóide (Figura 5) os núcleos do baço mostraram-se levemente dispersos quando comparados com o fígado.

Utilizando-se análise discriminante canônica, construiu-se três funções discriminantes, sendo uma para as células do fígado, outra para o baço e outra para as células de ambos órgãos.

Os coeficientes canônicos e a estrutura canônica das funções estão demonstrados na Tabela

A estrutura canônica determina qual variável teve maior participação na determinação da variável canônica.

Tabela 2. Coeficiente e estrutura canônica da função discriminante no baço e fígado de *Gallus gallus*

Varáveis dos Núcleos	Coeficientes Canônicos			Estrutura Canônica		
	Fígado	Baço	Fígado e Baço	Fígado	Baço	Fígado e Baço
Área	0,4948	-0,2024	0,1732	0,704	0,880	0,846
Perímetro	-0,5338	0,6942	0,0207	0,793	0,966*	0,930*
Esfericidade	-13,9139	-1,6538	-8,1465	-0,797*	-0,569	-0,679

\*indicam valores maiores da estrutura canônica

Aplicando-se os valores das variáveis mensuradas em cada célula na função discriminante obteve-se o valor de suas variáveis canônicas.

A média dos valores da variável canônica de cada célula é o valor utilizado para o diagnóstico diferencial da Doença de Marek e Leucose Linfóide (Tabela 3)

Tabela 3. Valor da variável Canônica utilizado para diagnóstico diferencial da doença de Marek (D.M) e leucose linfóide (L. L) nos fragmentos de fígado e baço de *Gallus gallus*

Órgãos Analisados	Variável Canônica	
	D.M	L.L
Fígado	> -12,992	<
Baço	> 4,437	<
Fígado e Baço	> -5,000	<

> e < indicam que os limites inferior e superior das variáveis canônicas para cada neoplasia.

A correlação canônica demonstrou que existiu associação positiva entre as variáveis área, perímetro e esfericidade entre as enfermidades.

O teste de Wilks Lambda e o teste T verificaram a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias das variáveis dos tumores avaliados.

Na Tabela 4 estão representados os erros percentuais estimados para cada função discriminante canônica, quando utilizada para identificar a neoplasia a que pertence uma determinada célula. Verificou-se que o baço possui menor erro estimado em comparação com o fígado e os dois juntamente.

Tabela 4. Erro estimado utilizando-se a função canônica para o diagnóstico diferencial da doença de Marek (D.M) e leucose linfóide (L. L) nos fragmentos de fígado e baço de *Gallus gallus*.

Órgãos Analisados	Erro Estimado	
	D.M	L.L
Fígado	33,6%	18%
Baço	28,4%	9,2%
Fígado e Baço	33,8%	14,4%

As Figuras 6,7 e 8, ilustram a distribuição das variáveis canônicas para baço, fígado e ambos, demonstrando as células identificadas corretamente em cada neoplasia.

SISBI/UFU  
215497

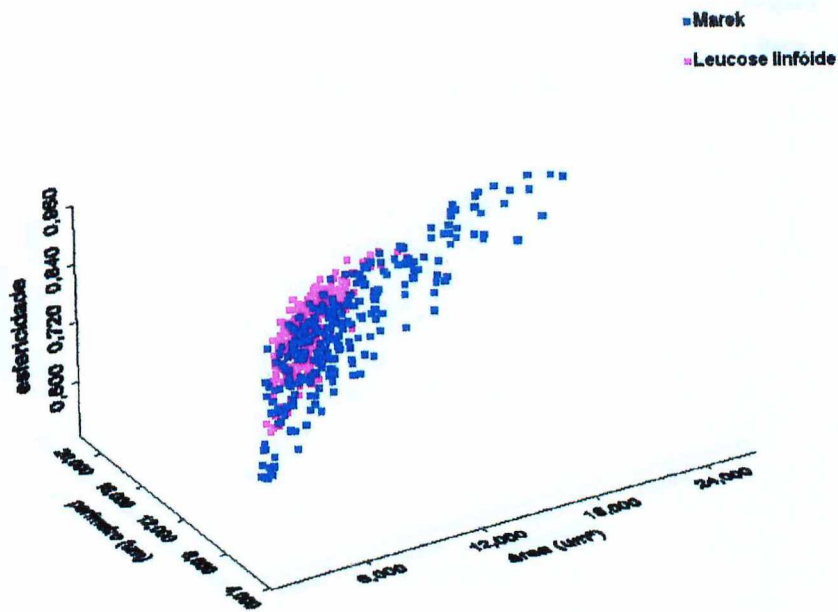


Figura 3. Visualização tridimensional dos núcleos celulares mensurados nos fragmentos de fígado de *Gallus gallus*, nas distintas neoplasias.

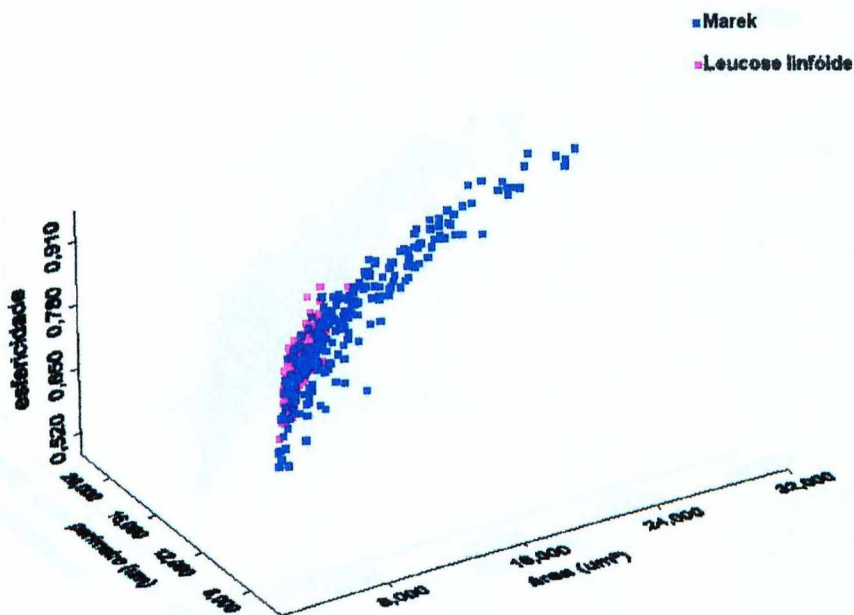


Figura 4. Visualização tridimensional dos núcleos celulares mensurados nos fragmentos de baço de *Gallus gallus*, nas distintas neoplasias.



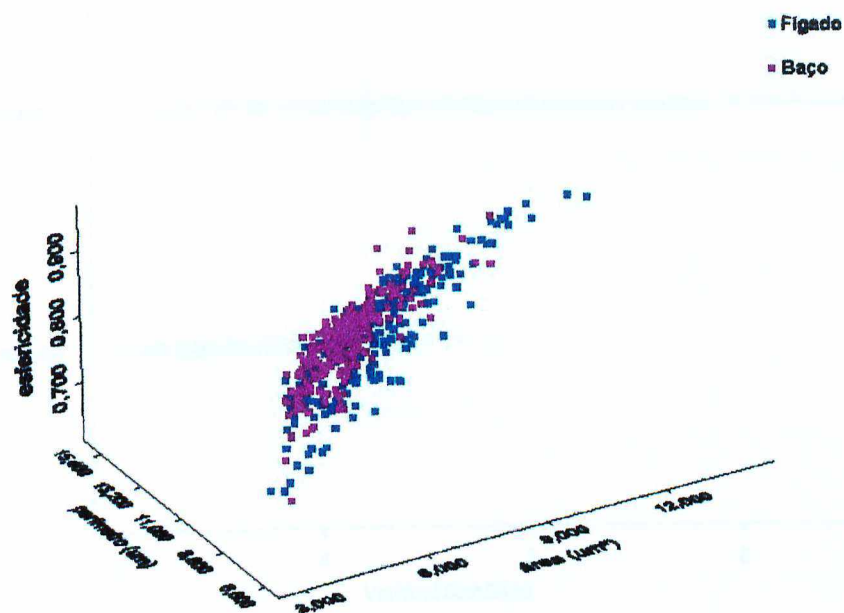


Figura 5. Visualização tridimensional dos núcleos celulares mensurados nos fragmentos de baço (vermelho) e fígado (azul), de *Gallus gallus* na leucose Linfóide.

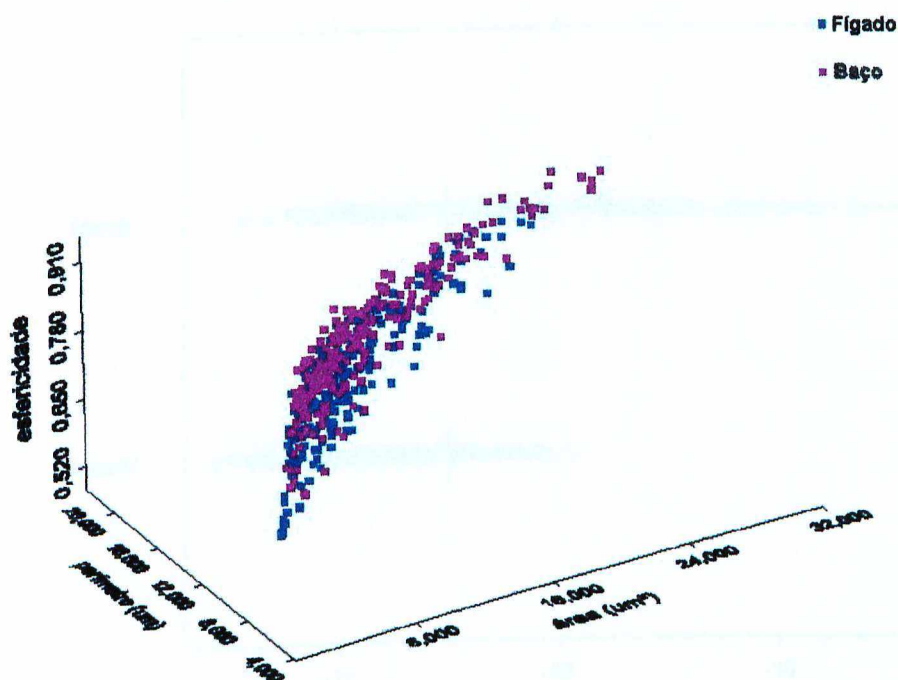


Figura 6. Visualização tridimensional dos núcleos celulares mensurados nos fragmentos de baço (vermelho) e fígado (azul), de *Gallus gallus* na Doença de Marek.

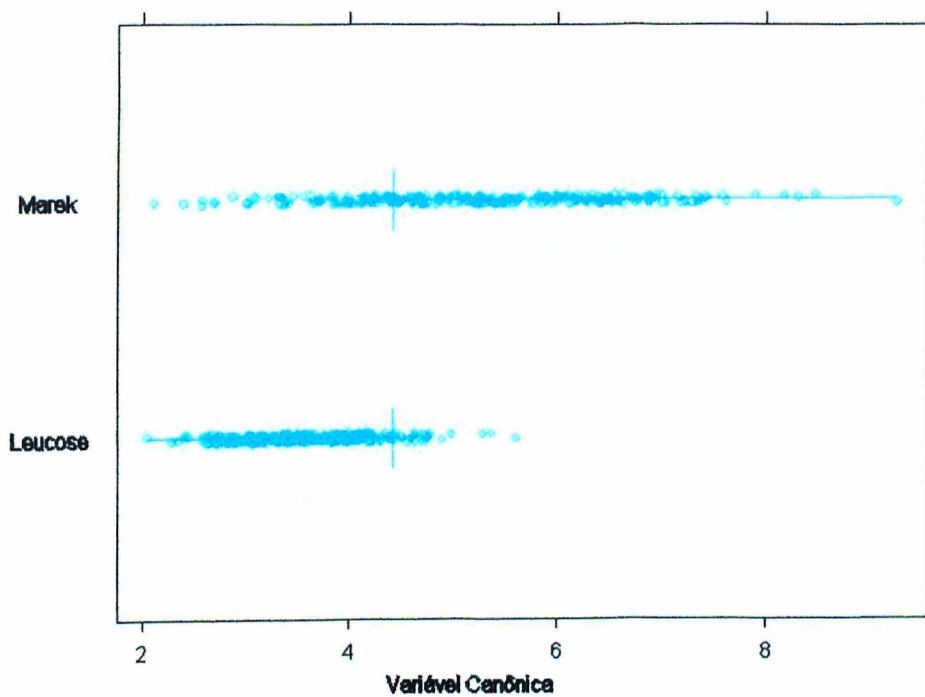


Figura 7. Visualização bidimensional demonstrando a Variável Canônica nos fragmentos de baço de *Gallus gallus*, nas distintas neoplasias. Os pontos sob as linhas são os valores identificados corretamente em cada neoplasia.

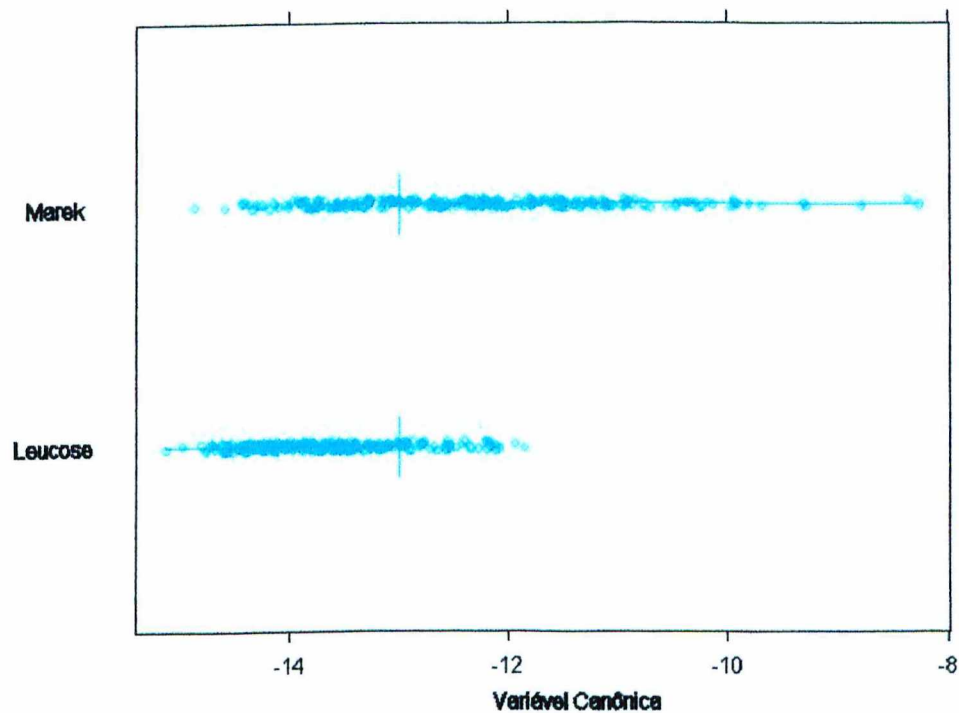


Figura 8. Visualização bidimensional demonstrando a Variável Canônica nos fragmentos de Fígado de *Gallus gallus*, nas distintas neoplasias. Os pontos sob as linhas são os valores identificados corretamente em cada neoplasia.

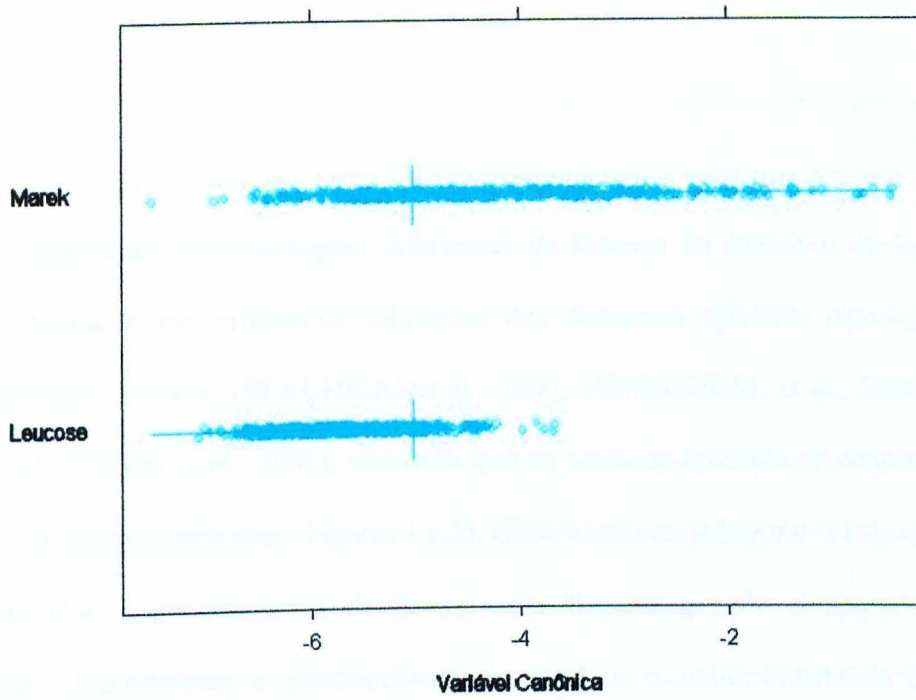


Figura 9. Visualização bidimensional da variável Canônica nos fragmentos de fígado e baço de *Gallus gallus*, nas distintas neoplasias. Os pontos sob as linhas são os valores identificados corretamente em cada neoplasia.

## DISCUSSÃO

O diagnóstico histopatológico diferencial da Doença de Marek e da Leucose Linfóide geralmente baseia-se em parâmetros subjetivos dos contornos celulares como o pleomorfismo celular encontrado na D.M. (BERCHIERI et al., 2000; VENUGOPAL et al., 2000; BIGGS et al., 2001 e BORENSTAIN et al., 2002), enquanto que na Leucose Linfóide os contornos celulares se apresentam de maneira uniforme ( Figuras 1 e 2). Observando-se as Figuras 3 e 4, verifica-se que as variáveis da D.M. apresentaram-se de forma mais dispersa quando comparadas com a L.L., comprovando objetivamente o pleomorfismo da D.M. e a uniformidade da L.L., até então subjetivos.

Huang et al.(2000) afirma que o pleomorfismo é uma observação subjetiva, pouco confiável. Neste experimento, com o uso da morfometria nuclear, conseguiu-se avaliar esta característica objetivamente ( Figuras 3 e 4).

Assim como Einstein et al.(1997), Carducci et al.(1999) conseguiram discernir tumores de diversas origens, utilizando morfometria nuclear, foi possível realizar o diagnóstico diferencial entre D.M. e L.L (Figuras 7, 8 e 9). Para melhor diferenciarmos as células das neoplasias estudadas, foi realizada a construção de uma função discriminante canônica. Esta função gera uma nova variável, denominada variável canônica, que melhor diferencia as células de cada neoplasia, pois concentra a capacidade de diferenciação das três variáveis características mensuradas em um único valor (Tabela 2).

Aplicando-se os valores das variáveis mensuradas na função discriminante, obteve-se o valor da variável canônica de cada célula. A média dos valores da variável canônica de todas as células avaliadas é o valor utilizado para o diagnóstico diferencial da Doença de Marek e Leucose Linfóide ( Tabela 3). Ou seja, após aplicar-se as mensurações de uma determinada célula na função

canônica, obtém-se sua variável canônica que, comparando-se com a média descrita anteriormente, possibilita determinar a qual neoplasia esta célula provavelmente pertence.

É importante salientar que a função canônica é diferente para cada órgão; conseqüentemente, o valor utilizado para diagnóstico diferencial é distinto para fígado (Figura 7), baço (Figura 8) e ambos (Figura 9).

A estrutura canônica demonstrada na Tabela 2 permite identificarmos a variável mensurada de maior importância na constituição da variável canônica. O maior valor absoluto na estrutura canônica define a variável de maior importância.

Assim, quando foram analisadas células neoplásicas de fígado, a esfericidade foi mais importante na formação da variável canônica. Contudo, as três características influenciaram de maneira muito semelhante a variável canônica, pois possuem valores muito próximos na estrutura canônica.

Por outro lado, quando foram analisadas células neoplásicas de fígado e baço conjuntamente, ou somente baço, a variável de maior importância foi o perímetro.

Estes dados diferem da afirmação de Nativ et al.(1997), Parada et al.(1999); Ozer et al.(2001), de que a área é a medida mais importante para se definir o progresso de tumores.

As diferenças verificadas com os testes de Wilks e teste T demonstraram que todas as características mensuradas são diferentes nos tumores analisados, contudo a associação positiva entre estas características demonstraram que o uso de uma função discriminante potencializou a capacidade de diferenciação destas variáveis.

Com a utilização da função canônica obteve-se um erro estimado diferente para cada órgão e tumor analisado, sendo que o diagnóstico realizado com células de baço teve um menor erro estimado, independente do tumor (Tabela 4).

O índice de acerto no diagnóstico diferencial é maior quando o tumor analisado é Leucose Linfóide, pois seu erro estimado é inferior ao da Doença de Marek, independente do órgão analisado.

É importante salientar que este erro estimado refere-se às células de um determinado caso que são identificados corretamente. Portanto, o índice de acerto de diagnóstico de casos é muito maior. O erro estimado de fígado e baço na doença de Marek (maior erro estimado, 33,8%) significa que se avaliarmos 100 células em D.M., 34 células serão identificadas como L.L. e 66 células serão identificadas como D.M., confirmando o diagnóstico.

Dey et al. (2000) utilizando morfometria nuclear no diagnóstico diferencial de carcinoma mamário, obtiveram um erro estimado de 11,3% nos casos avaliados. Nossos dados indicaram que esta metodologia é mais eficiente quando utilizada para diagnóstico diferencial de D.M. e L.L. Assim, o uso da morfometria nuclear computadorizada é uma importante ferramenta para auxiliar o diagnóstico histopatológico, tornando esta técnica mais objetiva.

## CONCLUSÃO

O uso da morfometria de núcleos computadorizada de células neoplásicas é útil no diagnóstico diferencial entre leucose linfóide e doença de Marek, tornando o diagnóstico histopatológico mais objetivo eficaz.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTENSTRASSER, et al. Reproducibility and efficiency testing of two sampling methods for image analysis in cytology. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 20, n. 2, p. 92-96, 1998.

BACUS, J.W., et al. Image morphometric nuclear grading of intraepithelial neoplastic lesions with applications to cancer chemoprevention trials. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, Baltimore, v. 8, n. 12, p. 1087-1094, 1999.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. Enfermidade de Marek, complexo leucótico aviário e reticuloendoteliose. In: CANAL, C.W.; SILVA, E.N. **Doença das aves**. FACTA, Campinas, p.255-265, 2000.

BIGGS, P.M. The history and biology of Marek's disease virus. **Current Topics Microbiology and Immunology**, Berlim, v. 255, p. 1-24, 2001.

BORENSHTAIN, R.; DAVIDSON, I. Marek's disease virus genome separation from feather tip extracts by pulsed field gel electrophoresis. **Journal Virology Methods**, Washington, v. 101, n.2, p. 169-174, 2002.

CALNEK, B.W.; WITTER, R.L. Marek's disease. In: CALNEK, B.W. et al. **Disease of poultry**. 9.ed. Ames: Iowa State University, p.342-385, 1991.



- CASTREN, J.P., et al. Nuclear morphometry in differential diagnosis of renal oncocytoma and renal cell carcinoma. **Journal of Urology**, Baltimore, v. 154, n. 4, p. 1302-1306, 1995.
- CARDUCCI, M., et al. Nuclear morphometry adds significant prognostic information to stage and grade for renal cell carcinoma. **Urology**, Secaucus, v. 53, n. 1, p. 44-49, 1999.
- COLOMBEL, M., et al. Prognostic evaluation of morphonuclear parameters in superficial and invasive bladder cancer. **British Journal of Urology**, Edinburgh, v. 75, n. 3, p. 364-369, 1995.
- CORAK, R. Morphological expression of immunosuppression in poultry. **Hayvan Asilardurlugu Dergisi**, v.18, n.32, p.47-59, 1994.
- DEY, P.; GHOSHAL; S., PATTARI; S. K. Automated image morphometry and prognosis of breast carcinoma. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 22, n. 6, p. 493-494, 2000.
- EINSTEIN, A.J., et al. Reproducibility and accuracy of interactive segmentation procedures for image analysis in cytology. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 188, n. 2, p. 136-148, 1997.
- FUKUZAWA, S., et al. Nuclear morphometry for improved prediction of the prognosis of human bladder carcinoma. **Cancer**, Philadelphia, v. 76, n. 10, p. 1790-1796, 1995.
- GAO, S., et al. Morphometric 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.

HAMILTON, P.W.; ALLEN, D.C. Morphometry in histopathology. **Journal of Pathology, Sussex**, v. 175, n. 4, p. 369-379.1995.

HUANG, J.; BAY, B. H.; TAN, P. H. Nuclear morfometry inbreast cancer: is pleomorfismo na ilusion. **Medical Hipotesis**, v. 55, n. 1, p. 26-28.2000.

HUBERTY, C.H. **Applied discriminant analysis**. New York; John Wiley & Sons.,1994

IKEGUCHI, M., et al. Computerized nuclear morphometry is a useful technique for evaluating the high metastatic potential of colorectal adenocarcinoma. **Cancer**, Phyladelphia, v. 86, n. 10, p. 1944-1951, 1999.

IKEGUCHI, M., et al. Computerized nuclear morphometry of hepatocellular carcinoma and its relation to proliferative activity. **Journal of Surgical Oncology**, New York, v. 68, n. 4, p. 225-230, 1998.

JALAVA, P.J., et al. Nuclear volume and breast cancer prognosis. **Anticancer Research**, Athens, v. 21, n.1B, p. 727-732, 2001.

KANAMARU, H., et al. Prognostic value of nuclear area index in combination with the World Health Organization grading system for patients with renal cell carcinoma. **Urology**, Secaucus, v. 57, n.2, p. 257-261, 2001.

KATSOULIS, M., et al. The prognostic value of morphometry in advanced epithelial ovarian cancers. **Cancer**, Philadelphia, v. 72, n.4, p. 958-963, 1995.

KAVANTZAS, N., LAZARIS, A.C., CHATZIGIANNI, E., et al. The nuclear morphometry by image analysis in the histopathologic diagnosis of lung cancer. **Journal of Experimental Clinical Cancer Research**, Rome, v. 19, n. 2, p. 201-206, 2000.

KRONQVIST, P.; KUOPIO, T.; COLLAN, Y. Morphometric grading of breast cancer: Thresholds for tubular differentiation. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 82, n. 10, p. 1656-1661, 2000.

LUNA, L.G. Routine staining procedures. In: \_\_\_\_\_. **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3.ed. New York: Mac Graw-Hill Book, p.32- 46, 1968.

LIU, C.Q., et al. Prognostic value of nuclear morphometry in patients with TNM stage T1 ovarian clear cell adenocarcinoma. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 79, n. 11-12, p. 1736-1741, 1999.

LIU, H.C., et al. A strategy to identify positional candidate genes conferring Marek's disease resistance by integrating DNA microarrays and genetic mapping. **Animal Genetics**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 351-359, 2001.

MAURI, M. F, et al. Morphometric analysis in prognostic evaluation of stage I thick cutaneous melanomas. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 19, n. 4, p. 311-315, 1997.

McLACHALAN, G.J. **Discriminant analysis and statistical pattern recognition**. Wiley; New York. 1992.

MEIJER, G.A.; MEUWISSEN, S.G.; BAAK, J.P. Classification of colorectal adenomas with quantitative pathology. Evaluation of morphometry, stereology, mitotic counts and syntactic structure analysis. **Analytical Cellular Pathology**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 311-323, 1995.

MILORĐ, R.A.; LECKSELL, K.; EPSTEIN J.I. Um Parâmetro morfológico para o auxílio no diagnóstico objective do carcinoma urotelial liso in situ. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 32, n. 9, p. 997-1002, 2000.

MINKUS, G., JUTTING, U., AUBELE, M., et al. Canine neuroendocrine tumors of the pancreas: a study using image analysis techniques for the discrimination of metastatic versus non-metastatic tumors. **Veterinary Pathology**, Washigton, v. 34, n. 2, p. 138-145, 1997.

MOMMERS, E.C.M., et al. Prognostic value of morphometry in patients with normal breast tissue or usual ductal hyperplasia of the breast. **International Journal of Cancer**, New York, v. 95, n. 5, p. 282-285, 2001.

MONTIRONI, R., et al. Morphometric index of adult renal cell carcinoma: Comparison with the Fuhrman grading system. **Virchows Archiv**, Secaucus, v. 437, n.1, p. 82-89, 2000.

NATIV,O., et al. Value of nuclear morphometry for differentiating localized from metastatic renal cell carcinoma. **European Urology**, Basel, v. 33, n. 2, p. 186-189, 1998.

OSTERMEIER, C. G., et al . Relation of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, New York, v. 22, n. 4, p. 595-603, 2001.

OZAKI, D.; KONDO, Y. Comparative morphometric studies of benign and malignant intraductal proliferative lesions of the breast by computerized image analysis. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 26, n. 10, p. 1109-1113, 1995.

OZER, E., et al. Prognostic significance of nuclear morphometry in superficial bladder cancer. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 23, n. 4, p. 251-256, 2001.

PARADA, D.; FARIAS, R.M.; GARCIA, T.J. Analisis morfometrico de variables en nucleos de celulas ductales normales y neoplasicas de la glandula mamaria. **Investigacion Clinica**, Maracaibo, v. 40, n. 4, p. 233-244, 1999.

PAYNE, L.N.; VENUGOPAL, K. Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticuloendotheliosis. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 19, n. 2, p. 544-564, 2000.

ROELS, S., et al. DNA ploidy and nuclear morphometric variables for the evaluation of melanocytic tumors in dogs and cats. **American Journal of Veterinary Research**., Chicago, v. 61, n. 9, p. 1074-1079, 2000.

RUIZ, S.A., et al. A Radial scar versus tubular carcinoma of the breast. A comparative study with quantitative techniques (morphometry, image- and flow cytometry). **Pathology Research and Practice**, Stuttgart, v. 191, n. 6, p. 547-554, 1995.

- RUIZ, S.A., et al. Benign, preinvasive and invasive ductal breast lesions. A comparative study with quantitative techniques: Morphometry, image- and flow cytometry. **Pathology Research and Practice.**, Stuttgart, v. 195, n. 11, p. 741-746, 1999.
- SILVA, P.L. Novas perspectivas no controle de doenças virais imunossupressoras-enfermidade de Marek /complexo leucótico aviário. In: CONFERÊNCIA APINCO'99 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1., 1999, Campinas. **Anais...**Campinas, 1999. p.53-66.
- SLUIS, W.V. Marek's disease. **World Poultry**, Surrey, p.1-35, dec.1997.
- SPYRIDONOS, P., et al. Computer-based grading of haematoxylin-eosin stained tissue sections of urinary bladder carcinomas. **Medical Informatics and the Internet in Medicine**, London, v. 26, n. 3, p. 179-190, 2001.
- TAN, P.H., et al. Correlation of nuclear morphometry with pathologic parameters in ductal carcinoma in situ of breast.. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 14, n. 10, p. 937-941, 2001.
- VENUGOPAL, K. Marek's disease: an update on oncogenic mechanisms and control. **Research Veterinary Science**, London, v. 69, n. 1, p. 17-23, 2000.
- VELTRI, R.W.; PARTIN, A.W.; MILLER, M.C. Quantitative nuclear grade (QNG): A new image analysis-based biomarker of clinically relevant nuclear structure alterations. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, n. 35, p. 151-157, 2000, Supplement.

VERNAU, W., et al. Morphometric analysis of bovine lymphomas classified according to the National Cancer Institute Working formulation. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 118, n. 4, p. 281-289, 1998.

VICO, G.; MAIOLINO, P. Prognostic value of nuclear morphometry in feline mammary carcinomas. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 117, n. 2, p. 99-105, 1997.

WEIGEND, S., et al. Resistance to Marek's disease virus in White Leghorn chickens: effects of avian leukosis virus infection genotype, reciprocal mating, and major histocompatibility complex. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, n. 8, p. 1064-1072, 2001.

WILLIAMS, R.A., et al. Discrimination between benign and malignant melanocytic skin lesions by multivariate analysis, quantitative S-100 immunohistochemistry, nuclear morphometry and DNA cytometry. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 21, n. 4, p. 353-357, 1999.

WOJCIK, E.M., et al. Value of computer-assisted quantitative nuclear grading in differentiation of normal urothelial cells from low and high grade transitional cell carcinoma. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 20, n. 1, p. 69-76, 1998.

ZAVALA, G. La enfermedad de Marek presente y futuro. **Avicultura Profesional**, Atlanta, v. 14, n.3, p.36-41, 1996.

## **NORMAS ADOTADAS**

**EURIDES, D. Normas técnicas para elaboração de projetos e publicações técnico- científicas.**

Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2001. 99p.