

JOYCE RICO VIDO

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS
E TEXTURA DA CROMATINA DOS
MIELOBLASTOS NAS SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS**



UNICAMP

CAMPINAS

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS
E TEXTURA DA CROMATINA DOS
MIELOBLASTOS NAS SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS**

Joyce Rico Vido

Tese de Mestrado apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas, departamento de Fisiopatologia Médica, da Universidade de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia médica, na área de Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento. Sob orientação da Prof^a Dr^a Irene Gyöngyver Heidemarie Lorand-Metze

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

V669a Vido, Joyce Rico, 1980 -
Análise dos parâmetros morfométricos e textura da cromatina dos blastos nas síndromes mielodisplásicas. / Joyce Rico Vido. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Irene Gyöngyver Heidemarie Lorand-Metze

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síndromes mielodisplásicas. 2. Medula óssea. 3. Análise de textura. 4. Cromatina. I. Lorand-Metze, Irene Gyöngyver Heidemarie. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Analysis of morphometric and nuclear texture parameters of immature granulocytic precursors in myelodysplastic syndromes

Palavra-chave em inglês:

Myelodysplastic syndromes

Bone marrow

Texture analyzes

Chromatin

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Irene Gyöngyver Heidemarie Lorand-Metze [Orientador]

Maria Luiza Silveira Mello

Luiz Fernando Lopes

Data da defesa: 06-05-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Joyce Rico Vido

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze

Membros:

Prof(a). Dr(a). Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze -

Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Silveira Mello -

Prof(a). Dr(a). Luiz Fernando Lopes -

Handwritten signatures in blue ink are placed over the names of the members. The signature for Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze is at the top, for Maria Luiza Silveira Mello in the middle, and for Luiz Fernando Lopes at the bottom.

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

Data: 06/05/2011

À minha querida mãe Rosa Elena, que sempre esteve e está presente em todos os momentos da minha vida, orientando, apoiando, acreditando e orando por mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tornar meu sonho possível e por ter proporcionado o encontro de pessoas especiais em meu caminho.

À Prof^a Dra. Irene Lorand-Metze, que me aceitou como aluna e teve toda paciência para me orientar com muita competência. Pela amizade e confiança que construímos durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Konradim Metze pela colaboração e apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Randall Luis Adam pela ajuda em minhas inúmeras dúvidas durante minha pesquisa.

Ao Dr. Eduardo I. Matsuda do Centro Infantil Boldrini, pela ajuda com minhas dúvidas sobre síndromes mielodisplásicas, pela ajuda com a identificação de células, pelo carinho, atenção e amizade.

À minha mãe Rosa Elena e aos meus avós, Elena e Ramiro que sempre me orientaram e me aconselharam em todas as minhas decisões.

Ao meu namorado Alex, que sempre me apoiou e me deu forças em momentos de estresse.

À minha tia Mary pelas várias caronas ao Hemocentro para eu realizar meu estudo.

À bióloga Mônica A. Falconi pela ajuda no Laboratório de Hematologia do Hemocentro.

À secretária do Hemocentro Nicete Romano pela sua competência e simpatia.

À secretária do curso de Fisiopatologia Médica, Salete Gobbi, pela ajuda em todas as minhas dúvidas, por sua competência e por ter sido muito solícita quando precisei.

Aos funcionários do Apoio didático do Hemocentro, Arlete e Leonardo pela ajuda com a formatação da minha tese.

"Mesmo quando estivermos fracos demais e não nos reste nenhuma fé, Ele continua fiel para conosco e nos ajudará, pois não pode repudiar-nos, porque somos parte dele mesmo. E Ele sempre cumprirá suas promessas a nós." 2 Tm 2:13

"Eu aprendi muito mais com os meus erros do que com meus acertos."

Thomas Edison (1847-1931)

RESUMO

A contagem de blastos na medula óssea (MO) é um parâmetro essencial para a classificação e prognóstico das síndromes mielodisplásicas (SMD). No entanto, neste grupo de doenças clonais há um alto grau de atipias de células hematopoiéticas da MO podendo ser difícil classificar com precisão os blastos mielóides. Nosso objetivo foi investigar se a análise de imagem computadorizada de esfregados de citologia de rotina corados com May-Grünwald-Giemsa seria capaz de caracterizar estas células. Precursores mielóides imaturos foram digitalizados e as imagens segmentadas de forma interativa usando esfregaços de MO: 30 casos de SMD recém-diagnosticados (15 RCMD, 11 AREB, 4 AR / ARSA) e 19 casos de MO normal. A classificação morfológica das células foi feita por consenso de dois observadores. A distribuição da cromatina nuclear foi analisada por variáveis de morfometria geométrica, variáveis derivadas da matriz de co-ocorrência e dimensão fractal (DF) para verificar sua utilidade na classificação destas células. Entre as 15 variáveis estudadas, todas, exceto área nuclear e homogeneidade local foram capazes de distinguir os blastos de promielócitos normais. Precursores atípicos mielóides que morfológicamente lembravam mieloblastos apresentaram valores intermediários entre blastos e promielócitos de acordo com 5 variáveis e foram classificados como promielócitos por mais 7 variáveis. A área nuclear não foi significativamente diferente entre os diversos tipos de células. Precursores mielóides atípicos imaturos da MO podem ser difíceis de classificar corretamente em citologia de rotina. Eles podem ser blastos com maturação anormal ou promielócitos atípicos. Como mudanças de textura da cromatina nuclear refletem a remodelação dinâmica da cromatina, a análise das variáveis obtidas pode ser útil para classificar objetivamente precursores imaturos mielóides nas SMD.

ABSTRACT

Bone marrow (BM) blast count is an essential parameter for classification and prognosis of myelodysplastic syndromes (MDS). However, in this group of clonal disorders a high degree of atypias in bone marrow hemopoietic cells may be found so that it may be difficult to quantify precisely myeloid blasts. Our aim was to investigate whether computerized image analysis of routine cytology would be able to characterize these cells. In May-Grünwald-Giemsa stained BM smears of 30 newly diagnosed MDS (15 RCMD, 11 RAEB, and 4 RA/RARS) patients and 19 cases of normal BM, blasts, promyelocytes and atypic myeloid precursors were digitalized and interactively segmented. The morphologic classification of the cells was done by consensus of two observers. Nuclear morphometry and texture features derived from the co-occurrence matrix and fractal dimension (FD) were calculated. Among the 13 variables studied, all except nuclear area and local homogeneity were able to distinguish blasts from promyelocytes. Atypic myeloid precursors that morphologically resembled myeloblasts showed intermediate values between blasts and promyelocytes according to 5 variables and were classified as promyelocytes by another 7 variables. Nuclear area was not significantly different among the cells. BM atypical immature myeloid precursors may be difficult to classify correctly in routine cytology. They could be abnormally maturing blasts or atypical promyelocytes. As nuclear texture changes reflect chromatin remodeling dynamics, the analysis of the variables obtained by image analysis may be useful to objectively classify immature myeloid precursors in MDS.

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Anemia Refratária
AREB-1	Anemia Refratária com Excesso de Blastos
AREB-2	Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2
ARSA	Anemia Refrataria com Sideroblastos em Anel
CMV	Citomegalovírus
CRDM	Citopenia Refrataria com Displasia de Múltiplas Linhagens
CRDU	Citopenia Refratária com Displasia em uma Linhagem
DF	Dimensão Fractal
ELN	<i>European Leukemianet</i>
FAB	French – American - British
FTT	Transformadas de Fourier
GB	Glóbulos Brancos
Hb	Hemoglobina
HIV	Imunodeficiência Adquirida
HPN	Hemoglobina Paroxística Noturna
IPSS	Sistema Internacional de Pontuação para Prognóstico, traduzido do inglês: <i>International Prognostic Scoring System</i>
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MO	Medula Óssea
NR	Neutropenia Refratária
OMS	Organização Mundial da Saúde
Plaq	Plaquetas
PTI	Púrpura Trombocitopênica Idiopática
SMD	Síndromes Mielodisplásicas
SMD-I	SMD inclassificável
TR	Trombocitopenia refratária

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das SMD segundo o grupo FAB	19
Tabela 2: Classificação das SMD segundo a OMS – 2008	20
Tabela 3. Fatores prognósticos de acordo com a classificação IPSS para SMD	22
Tabela 4: Grupos de risco de acordo com a soma de pontos na classificação IPSS e sobrevida em anos	22
Tabela 5. Média dos dados clínicos dos casos NORMAIS	35
Tabela 6. Morfometria geométrica - casos normais	36
Tabela 7. Matriz de co-ocorrência – casos normais	36
Tabela 8. Variáveis de dimensão fractal e Fourier – casos normais.....	37
Tabela 9. Média dos dados clínicos dos casos SMD	38
Tabela 10. Morfometria geométrica – casos SMD.....	38
Tabela 11. Variáveis da matriz de co-ocorrência – casos SMD.....	39
Tabela 12: Variáveis de dimensão fractal e Fourier – casos SMD.....	41
Tabela 13. Variáveis usadas na diferenciacao de mieloblastos normais e dos casos de SMD.....	42
Tabela 14. Variáveis usadas na diferenciação de promielócitos normais de casos de SMD	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de blastos nas SMD	21
Figura 2: Tipos de blastos nas SMD. A: Blasto tipo I, B: Blasto tipo II.....	21
Figura 3: Precusores granulocíticos imaturos observados nos casos de SMD.	28
Figura 4: Microscópio Leica DG500 com captura de imagens.....	29
Figura 5: Programa Limiar para segmentação nuclear das células. A imagem acima, à esquerda é a imagem digital original. Abaixo, o mesmo núcleo após a segmentação.	32
Figura 6: Classificação das células atípicas como intermediário segundo o desvio padrão do nível de cinza.	39
Figura 7: Classificação das células atípicas como promielócito segundo a inércia.	40
Figura 8: Classificação das células atípicas como promielócito segundo a energia.	41

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
SUMÁRIO.....	xiv
INTRODUÇÃO.....	xvi
1.1 As Síndromes Mielodisplásicas.....	17
1.1.1 Critérios Diagnósticos	17
1.1.2 Diagnóstico de Exclusão	18
1.1.3 Classificação.....	18
1.1.4 Fatores Prognósticos.....	21
1.1.5 A Textura Nuclear e Análise de Imagens.....	23
OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivos Gerais	25
2.2 Objetivos Específicos	25
PACIENTES E MÉTODOS.....	26
3.1 Medula Óssea Normal	27
3.2 Casos de SMD	27
3.2.1 Critérios Diagnósticos e Classificação	27
3.3 Análise de imagem	28
3.3.1 Aquisição	28
3.3.2 Segmentação.....	30
3.3.3 As variáveis	30
3.4 Análise estatística	32
RESULTADOS	34
4.1 A análise dos casos normais	35
4.2 A análise dos casos SMD	37

4.3 Comparação entre os mieloblastos normais e mieloblastos SMD.....	41
4.4 Comparação entre os promielócitos normais e promielócitos SMD	42
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 As Síndromes Mielodisplásicas

1.1.1 Critérios Diagnósticos

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) compreendem um grupo de doenças clonais das células da medula óssea (MO) que apresentam anormalidades variadas de proliferação e maturação causando citopenias no sangue periférico e MO hiperclular, devido a uma hematopoese ineficaz. Um terço dos casos evolui para uma leucemia aguda.

Estas síndromes ocorrem predominantemente em pacientes acima de 50 anos, sendo raras na infância. (1) A incidência de anemia em pacientes idosos é comum e freqüente, pois as condições da MO nesta idade favorecem o aparecimento de clones anormais decorrentes do próprio envelhecimento, propiciando o desenvolvimento de mielodisplasias (2).

O diagnóstico é baseado em dados do hemograma, achados citológicos e histológicos da medula óssea e evidências de alterações clonais detectadas por técnicas de citogenéticas convencionais e moleculares. Sendo a citologia da MO primordial para o diagnóstico e classificação das SMD (3,4)

Podemos contar também com o auxílio da citometria de fluxo como uma ferramenta útil no diagnóstico das SMD pela detecção de expressões anômalas dos antígenos celulares relacionados a linhagem e maturação. Podemos também quantificar o número de células CD34⁺, o que prediz a progressão do clone neoplásico (5,6).

A principal característica das SMD, no sangue periférico, são as citopenias. Pode haver presença de granulócitos imaturos, até mieloblastos. No exame citológico da MO é avaliada a morfologia das três séries hematopoiéticas, bem como as suas atipias e é contado o número de blastos. Importante para o diagnóstico diferencial da leucemia aguda e da anemia refratária com excesso de blasto (AREB), a porcentagem dos mieloblastos na MO se baseia nos critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) (7,8).

Entretanto há uma dificuldade em se classificar as células imaturas e quantificar o número de mieloblastos, uma vez que o distúrbio de maturação e as atipias presentes na medula óssea podem dificultar a classificação correta dos precursores. Assim o limite entre SMD e leucemia aguda pode ser difícil de ser estabelecida (5).

Portanto, é necessário que se tenha uma definição inequívoca de quais células são blásticas, dado que é o mais importante fator prognóstico na SMD, em termos de sobrevida global e risco de progressão leucêmica (9). Para isso a padronização dos critérios morfológicos tem sido recomendada (5,7)

1.1.2 Diagnóstico de Exclusão

Há uma série de causas de citopenias periféricas devidas a alterações hematopoiéticas não clonais, e que podem causar alterações morfológicas nas células hematopoiéticas da MO. Para excluí-las é importante averiguar o histórico dos pacientes em relação ao etilismo e uso de medicamentos e realizar testes laboratoriais para investigar deficiências nutricionais – folato e vitamina B₁₂ –, insuficiência renal, hepática e tireoidiana, hemoglobina paroxística noturna (HPN), doenças auto-imunes e infecções virais tais como hepatites, citomegalovírus (CMV), toxoplasmose, parvovírus e vírus da imunodeficiência adquirida (HIV).

Casos de pacientes soropositivos para HIV se destacam no protocolo de exclusão por apresentarem citopenias e alterações morfológicas na MO com muitas atipias. Portanto, o diagnóstico de SMD é um diagnóstico de exclusão. Pelo menos 50% dos pacientes que se apresentam com quadro de citopenias e alterações morfológicas medulares podem não apresentar doenças clonais (1,10,11).

1.1.3 Classificação

A SMD foi inicialmente descrita em 1982 como “pre-leucemia”. Em 1985 foi descrita a primeira classificação pelo grupo FAB (French-American-British). (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das SMD segundo o grupo FAB

Tipo	Sangue Periférico	Medula óssea
Anemia refratária (AR)	Blastos \leq 1%	Blastos \leq 5%
Anemia refratária com sideroblasto em anel (ARSA)	Blastos \leq 1%	Blastos \leq 5% Sideroblasto em anel > 15%
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB)	Blastos < 5%	Blastos > 5% e < 20%
Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)	Blastos < 5% Monócitos > 1000/mm ³	Blastos < 20%
Anemia refratária com excesso de blasto em transformação (AREB-T)	Blastos \geq 5%	Blastos entre > 20% e < 30% ou com bastonete de Auer

A Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs, em 2001, uma nova classificação que correlacionava os dados da citogenética com os parâmetros clínicos, morfológicos e citoquímicos que foram utilizados na classificação FAB. Em 2008, os critérios diagnósticos foram revistos e publicados com algumas alterações incluindo uma classificação provisória de citopenia refratária na infância (12). A base de classificação da OMS é a avaliação das células hematopoiéticas na medula óssea, além da contagem do número de mieloblastos (Tabela 2) (13).

Os mieloblastos das SMD podem ser apresentar como blastos tipo I, II e III. Blastos tipo I são menores, possuem alta relação núcleo citoplasma com cromatina fina e frouxa, apresentam nucléolos, sem grânulos e basofilia discreta não apresentando bastão de Auer (Figuras 1 e 2).

Blastos tipo II são maiores que o I, menor relação núcleo citoplasma com discreta granulação, cromatina condensada, nucléolos e Golgi proeminente. Blastos tipo III, semelhantes ao tipo II, porém com granulação azurófila abundante.

Tabela 2: Classificação das SMD segundo a OMS – 2008 (12)

Tipo	Sangue periférico	Medula óssea
Citopenia refratária com displasia em uma linhagem (CRDU); Anemia Refratária (AR); Neutropenia refratária (NR); Trombocitopenia refratária (TR)	Unicitopenia ou bicitopenia ¹ Blastos raros ou ausentes (<1%) ²	Displasia única linhagem: ≥10% das células em uma linhagem mielóide <5% blastos <15% dos precursores eritroides são sideroblastos em anel.
Anemia Refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	Anemia Blastos ausentes	Displasia linhagem eritróide, ≥15% sideroblastos em anel, <5% blastos
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRDM)	Citopenia(s) Blastos raros ou ausentes (<1%) ² Bastão de Auer ausente Monócitos <1x10 ⁹ /L	Displasia ≥10% células de duas ou mais linhagens de células mielóide (neutrófilos e/ou precursores eritroides e/ou megacariócitos ±15% sideroblasto em anel <5% blastos, Bastão de Auer ausente
Anemia refratária com excesso de blastos-1 (AREB-1)	Citopenia(s) <5% blastos Bastão de Auer ausente Monócitos <1x10 ⁹ /L	Displasia em uma ou múltipla linhagem 5-9% blastos ² Bastão de Auer ausente
Anemia refratária com excesso de blastos-2 (AREB-2)	Citopenia(s) 5-19% blastos Bastão de Auer ± ³ Monócitos <1x10 ⁹ /L	Displasia em uma ou múltipla linhagem 10-19% blastos Bastão de Auer ± ³
SMD inclassificável (SMD-I)	Citopenias ≤1% blasto ²	Displasia inequívoca < 10% das células em uma ou mais linhas de células mielóides quando acompanhado por uma anormalidade citogenética considerado como evidência presuntiva para o diagnóstico de SMD <5% blastos
SMD associado com del (5q)	Anemia. Plaquetas normais ou elevadas Blastos raros ou ausentes (<1%)	Megacariócitos em número normal ou elevado, com núcleo hipolobulado. <5% blastos Bastão de Auer ausente Isolada del (5q)

¹Bicitopenia pode ser observada. Casos com pancitopenia podem ser classificados como SMD-I.

²Se a porcentagem de blastos na medula óssea for <5% mas se houver 2-4% mieloblastos no sangue, a classificação diagnóstica será AREB 1. Casos de CRDU e CRDM com 1% mieloblastos no sangue podem ser classificadas como SMD-I.

³Casos com bastão de Auer e 5% de mieloblastos no sangue e <10% na medula óssea podem ser classificados como AREB 2.

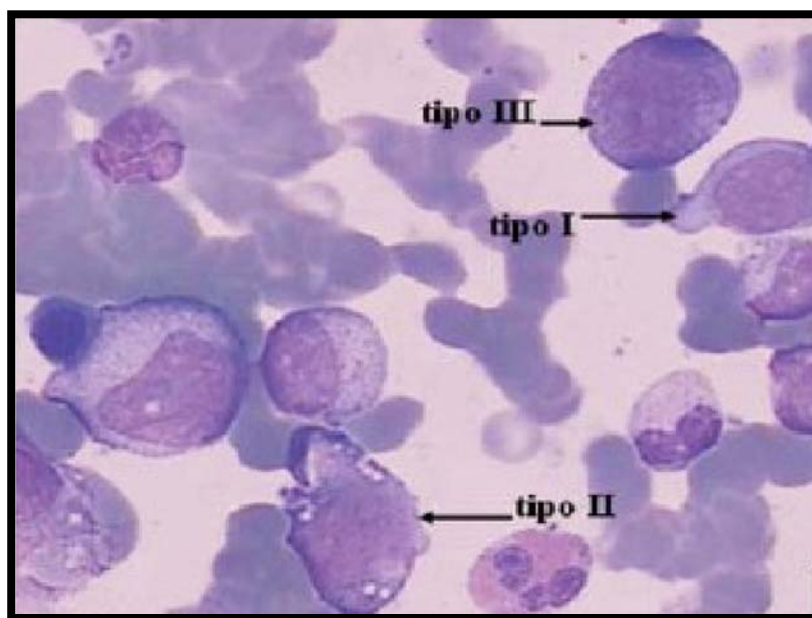


Figura 1: Tipos de blastos nas SMD (14)

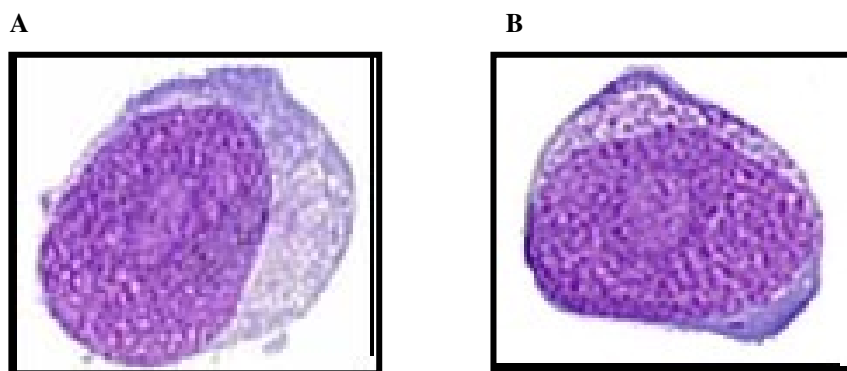


Figura 2: Tipos de blastos nas SMD. A: Blasto tipo I, B: Blasto tipo II

1.1.4 Fatores Prognósticos

As características prognósticas variam entre os pacientes (8). Alguns podem ter evolucao muito longa nao necessitando de tratamento, mas outros podem ter piora rapida das citopenias, ou mesmo evoluir para leucemia aguda.

Greenberg e colaboradores implementaram um sistema de pontuação baseada em parâmetros prognósticos como: porcentagem de blastos, cariótipo e número de citopenias podendo desse modo, classificar os pacientes de acordo com suas características biológicas e clínicas. O *International Prognostic Scoring System* (IPSS) (Tabela 3) prediz sobrevida

ou evolução para leucemia mielóide aguda (LMA), baseada na porcentagem de blastos na MO (7,12).

Introduzido em 1997, o IPSS foi concebido de forma a traduzir o grau de gravidade da doença a partir de parâmetros do hemograma, MO e citogenética. O IPSS classifica o paciente em baixo risco, intermediário 1, intermediário 2 e alto risco (Tabela 4).

Tabela 3. Fatores prognósticos de acordo com a classificação IPSS para SMD (12)

Pontuação	0	0,5	1	1,5	2
Blastos na M.O. (%)	<5	5 a 10	–	11 a 20	21 a 30*
Cariótipo **	Baixo risco	intermediário	Alto risco		
Citopenias ***	0 a 1	2 a 3			

*Este grupo é reconhecido como LMA na classificação OMS.

**Cariótipo: Baixo risco = normal, -Y, del (5q), del (20q);

Alto risco = cariótipos complexos (≥ 3 anormalidades) ou anormalidades do 7

Intermediário = todas as demais alterações citogenéticas.

***Citopenias: Hb < 10g/dL

Neutrófilos < $1,8 \times 10^9/L$

Plaquetas < $100 \times 10^9/L$

Tabela 4: Grupos de risco de acordo com a soma de pontos na classificação IPSS e sobrevida em anos (8)

Grupo de Risco	Pontuação	Sobrevida (anos)
Baixo	0	5,7
Intermediário I	0,5 a 1,0	3,5
Intermediário II	1,5 a 2,0	1,2
Alto	>2,5	0,4

1.1.5 A Textura Nuclear e Análise de Imagens

A análise computacional de imagens microscópicas digitalizadas é uma técnica objetiva e reproduzível para o diagnóstico de características celulares, e especialmente nucleares (15,16). Nesse contexto, a análise da textura nuclear permitiu diagnosticar neoplasias, estabelecendo as diferenças dos tecidos normais para os neoplásicos (17,18,19,20-22). As mudanças na textura nuclear dos tecidos analisados, além de mudanças no conteúdo do DNA, puderam refletir a remodelação da cromatina causada por determinadas drogas como 17- β -estradiol e ácido valpróico (AVP), caracterizando a transformação neoplásica (16,23,24). A redistribuição da cromatina nuclear, medida pelas técnicas de análise de imagens reconhece alterações epigenéticas importantes na etiopatogenia das neoplasias hematológicas como LMAs e nas SMDs. (16,25,26). O estudo da dimensão fractal da cromatina nuclear em neoplasias tem provado ser um importante fator prognóstico (23,27-30).

Há diversos parâmetros para estudar a textura de imagens digitais (31). Entretanto, o impacto das variações na coloração ou textura da análise morfométrica também pode depender, em grande parte do tipo de variável analisada (32).

Portanto, os dados da morfometria geométrica, a matriz de co-ocorrência, a dimensão fractal (Fourier e Minkowisk), a análise da granularidade de cromatina (25) e a execução das transformadas de Fourier (FFT), permitem o conhecimento detalhado da textura da cromatina nuclear. Por essa técnica detectamos também sutis alterações morfológicas que não são reconhecidas pela microscopia convencional nem mesmo por um especialista.

Além disso, permitiremos encontrar, com o desenvolvimento da microscopia digital como uma ferramenta de trabalho em laboratórios de rotina e de telemedicina, importantes variáveis para classificação das células.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Verificar se a morfometria é uma ferramenta útil no diagnóstico e na quantificação de mieloblastos nas SMD, tendo em vista as dificuldades diagnósticas e principalmente em casos com poucas atipias e cariótipo normal.

2.2 Objetivos Específicos

1. Analisar a medula normal no sentido de verificar a variação dos parâmetros morfométricos estudados durante a maturação da granulopoese normal.
2. Verificar quais dos parâmetros da análise da cromatina estudados foram melhores para discriminar as diversas fases de maturação na granulopoese normal e quais foram importantes para diferenciar mieloblastos de promielócitos.
3. Comparar os valores obtidos nas células normais e nas dos pacientes com mielodisplasia.
4. Pela análise de imagem, classificar precursores mieloides atípicos.

Pacientes e Métodos

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Medula Óssea Normal

Lâminas de esfregaço de sangue de MO coradas com May-Grünwald-Giemsa, arquivadas no laboratório de hematologia do Hemocentro da Unicamp foram usadas para o presente estudo.

Como controles foram estudados casos com coleta de medula de 2007 a 2009. Os critérios de inclusão foram: idade adulta, doenças sem comprometimento medular como Púrpura (PTI), pacientes em estadiamento de linfomas.

As lâminas de esfregaço de sangue de MO utilizadas estavam em perfeitas condições de observação, ou seja, o esfregaço estava apropriado para a captura de imagens, as células estavam íntegras, não havia empilhamento celular e a coloração do esfregaço estava adequada, não havendo lâminas com coloração carregada ou muito clara para não interferir na análise de imagem.

3.2 Casos de SMD

3.2.1 Critérios Diagnósticos e Classificação

Entraram no estudo, pacientes adultos com diagnóstico de SMD entre os anos 2007 e 2009.

O diagnóstico foi realizado segundo critérios OMS 2008 (7). Os mesmos critérios para o estudo de lâminas dos casos normais foram usados para a escolha dos casos de SMD, bem como a captura de imagens.

3.3 Análise de imagem

3.3.1 Aquisição

Foi usado o microscópio binocular Leica DC 500 com sistema digital (formato-bmp; o espaçamento entre amostra de 0.1µm/pixel) com a objetiva de 100 aumentos de imersão a óleo para aquisição interativa das imagens (Figura 4). Foram capturadas imagens de células consecutivas da linhagem mielóide.

Capturamos aproximadamente 30 células entre mieloblastos e promielócitos de cada lâmina de MO dos casos normais assim como também foram capturadas em torno de 30 células entre mieloblastos, promielócitos e células imaturas atípicas de cada lâmina de MO dos casos de SMD. Foram consideradas como células precursoras mielóides imaturas atípicas aquelas nas quais não houve concordância entre dois observadores ao classificar estas células. Todas as imagens foram digitalizadas, nomeadas e em seguida foram segmentados os núcleos de forma interativa.

As imagens foram adquiridas pelo mesmo operador e a classificação morfológica das células, por consenso, foi feita por dois especialistas independentes de acordo com os critérios da OMS (13). As células que não possuíam características de mieloblastos e nem de promielócitos foram consideradas como atípicas.

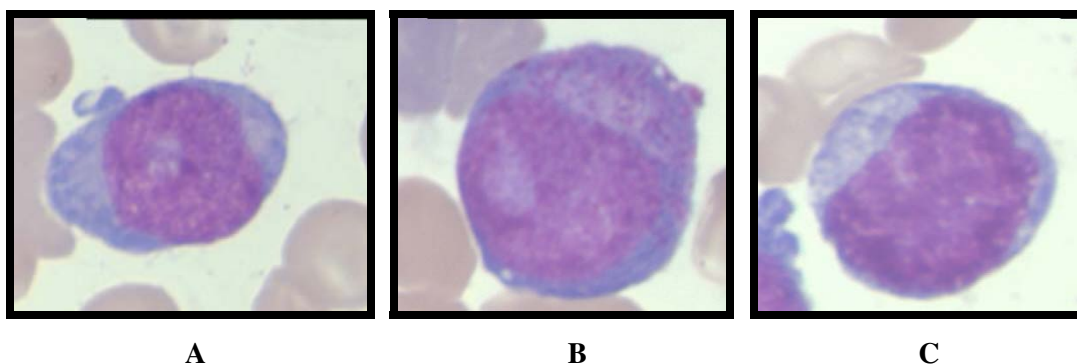


Figura 3: Precursores granulocíticos imaturos observados nos casos de SMD. **A:** Mieloblasto, **B:** Promielócito, **C:** Precursor granulocítico imaturo atípico. Corados com May-Grünwald-Giemsa x1000.

A figura 3.A exibe um mieloblasto. O promielócito (figura 3.B) é uma célula que possui a “zona” de Golgi visível, baixa relação núcleo citoplasma e núcleo excêntrico com numerosos grânulos citoplasmáticos (33). Embora algumas células blásticas possuam a “zona” de Golgi elas não possuem as outras características dos promielócitos.

As células atípicas (figura 3.C) podem apresentar-se com citoplasma pouco granular com alta relação núcleo citoplasma e assincronismo de maturação. Em determinados casos é difícil a classificação desses tipos celulares em mieloblastos ou promielócitos.



Figura 4: Microscópio Leica DG500 com captura de imagens.

Foram respeitados os seguintes critérios para seleção das imagens:

- a) Somente foram consideradas as células sem sobreposição, pregas no citoplasma ou dobramentos, sem precipitados de corante;
- b) Não foram consideradas as células que apresentavam superposição entre si ou ligadas a hemácias;
- c) Cada imagem nuclear foi adquirida no melhor foco em que os contornos da célula se apresentaram nítidos na maior parte do perímetro da carioteca.

3.3.2 Segmentação

Depois de capturadas, as imagens foram convertidas para o formato *bitmap* a fim de uniformizar o grau de brilho das imagens. Pela técnica de *thresholding* (técnica de segmentação de imagem mais usada) do programa de segmentação, o núcleo de cada célula foi isolado (Figura 5). Já isolados, os núcleos foram convertidos em escala de cinza com níveis de luminância entre 0 e 255, sendo esta mais brilhante.

No momento da segmentação, a identificação da célula foi feita através de um comando no programa de aquisição de modo a facilitar a organizá-las em tabelas mostrando o tipo da célula, o número da lâmina e o número da imagem.

Após a padronização dos normais, foram analisadas as lâminas de medula óssea colhidas na rotina diagnóstica dos casos novos de SMD.

3.3.3 As variáveis

Foram estudadas as seguintes variáveis para a análise da textura da cromatina:

- Morfometria geométrica:
 - Área nuclear;
 - Perímetro 8 – avalia os pixels das bordas da imagem obtendo objetos com conexidade 8;
 - Fator de forma 8 – avalia quão próxima é da circunferência a forma do contorno da imagem segmentada. Quanto mais próxima da forma arredondada, o fator de forma se aproxima de 1. O FF8 utiliza na fórmula o Perímetro 8;
 - Desvio padrão do nível de cinza.
- Variáveis derivadas da matriz de co-ocorrência são calculadas a partir da relação entre os pixels vizinhos em uma imagem convertida em graus de cinza e descrevem o quanto a possibilidade de relação entre os pixels se repete na imagem. Um dos métodos mais usados para análise de textura foi proposto pela primeira vez por Haralick em 1973 (34).

Dentre as treze medidas propostas por ele, sete foram usadas nesse trabalho:

- Entropia de Haralick: fornece o grau de dispersão de níveis de cinza de uma imagem.
 - Inércia: semelhante ao contraste, descrita por Haralick em anos posteriores. A inércia é maior quando a imagem tiver transições abruptas de brilho.
 - Homogeneidade local: mede a homogeneidade entre os pixels de uma imagem. Grandes valores para regiões com níveis de cinza similares
 - Energia: avalia a uniformidade da textura. Quanto menor a uniformidade entre os graus de cinza, menor é a energia.
 - Contraste: descrita por primeira vez por Haralick (34), quanto maior o contraste, maior a variação abrupta de brilho.
 - Momento Diagonal: conceito semelhante ao contraste. Variações abruptas de brilho na imagem realçam a diagonal principal da matriz de co-ocorrência.
 - Proeminência local ($\times 10^{-5}$): mede se a imagem é mais clara ou mais escura. Se a cromatina transpassa mais luz a proeminência é maior.
- Dimensão Fractal: é usada para caracterizar a complexidade de uma textura. Ela mede auto-semelhança independente de escala dentro de uma estrutura complexa e tem a ver com o seu grau de irregularidade (20,23,35). Fractais são formas complexas que não podem ser medidas apenas por dimensão topológica. Pode-se afirmar que a dimensão fractal de um conjunto é um valor que diz o quão densamente um conjunto ocupa o espaço métrico em que ele existe. Quanto maior a irregularidade de uma forma, maior é a sua Dimensão Fractal.
 - O parâmetro “goodness-of-fit” (grau de adaptação ao fractal perfeito) ou R^2 , também denominado grau de aproximação da dimensão fractal (DF), avalia o grau de granularidade e regularidade da imagem nuclear (3,27,32, 35,36). Dimensão Fractal de acordo com Fourier.
 - Anel 1: Mede a variação suave de brilho da imagem.

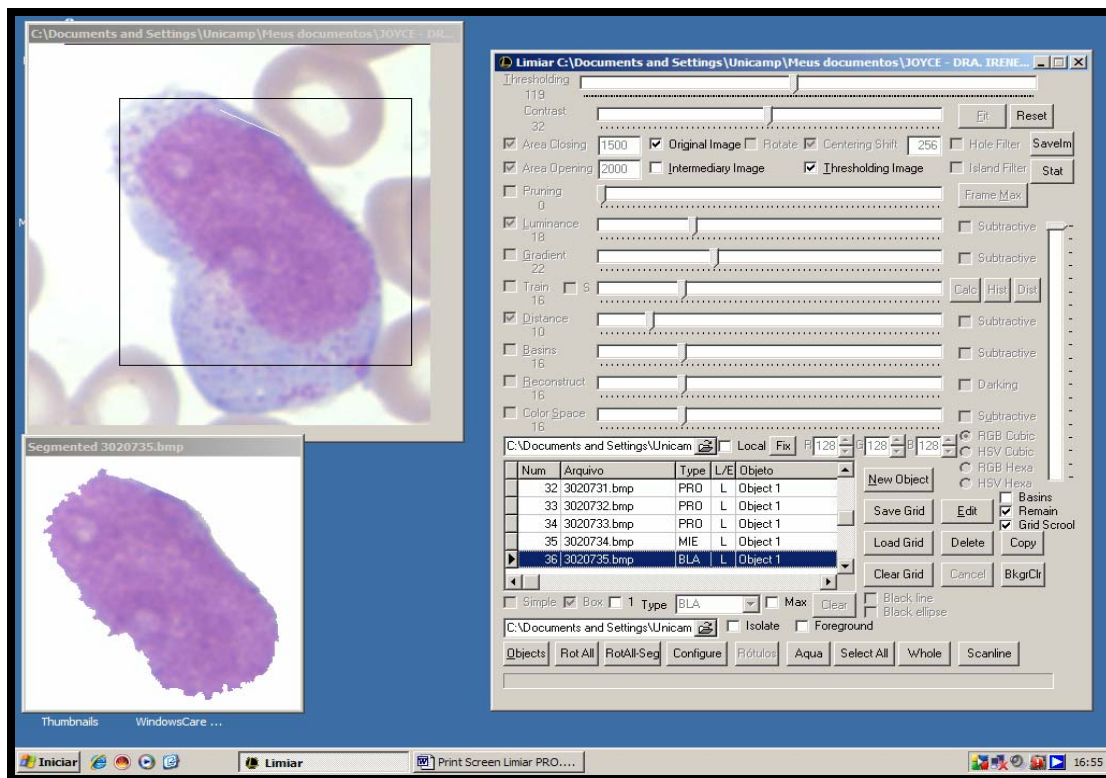


Figura 5: Programa Limiar para segmentação nuclear das células. A imagem acima, à esquerda é a imagem digital original. Abaixo, o mesmo núcleo após a segmentação.

O cálculo das variáveis morfométricas geométrica, da matriz de co-ocorrência e de Fourier foi feito, sendo que na medula óssea normal foram analisadas as variáveis que diferenciavam Blastos dos Promielócitos. Foram aplicados estes parâmetros às células atípicas das SMDs.

3.4 Análise estatística

Primeiro, foram comparados os valores obtidos para os mieloblastos e promielócitos normais para todas as características morfométricas e de textura nuclear utilizando o teste t-dependente. O teste t de Student foi utilizado para comparar as características morfométricas e de textura de blastos normais e da SMD e dos promielócitos normais e da SMD. Numa terceira etapa, as diferenças entre as características nucleares de blastos,

promielócitos e precursores mielóides atípicos dos pacientes com SMD foram calculadas pela análise de variância para medidas repetidas.

Diferenças entre blastos e precursores atípicos mielóides ou entre estes e promielócitos foram calculados com a ajuda de testes-t pareados, com correção do erro alfa.

Quando houve diferença significativa entre o valor dos blastos e atípicos mas não destes e os prómielócitos, os atípicos foram considerados como prómielócitos. Quando não houve diferença entre atípicos e blastos, mas sim entre atípicos e promielócitos, eles foram classificados como blastos. Se não houve diferença entre blastos e atípicos e estes e promielócitos ou se todos estes valores foram significativamente diferentes, os atípicos foram considerados intermediários entre blastos e promielócitos.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 A análise dos casos normais

Nós analisamos esfregaços de MO de 19 casos normais. A idade mediana dos pacientes com MO normal foi de 57 anos (24 a 85 anos), sendo 9 homens e 10 mulheres (Tabela 5). Os casos normais foram selecionados a partir das indicações da MO como neutropenia, plaquetopenia, sem evidência de infiltração tumoral e linfomas, as quais evidenciaram MO morfológicamente normal. Quinze variáveis foram analisadas: 4 de morfometria geométrica (Tabela 6), 7 de co-ocorrência de matriz (Tabela 7) e 4 sobre DF (Tabela 8). Na MO normal, 12 variáveis (exceto área e homogeneidade local e DF Minkowski) apresentaram valores significativamente diferentes para os blastos e promielócitos.

Tabela 5. Média dos dados clínicos dos casos NORMAIS

Casos (n°)	19
Idade (anos)	57
GB ($\times 10^3/\text{mm}^3$)*	4.46
Hb (g/dL)*	11.7
Plaq ($\times 10^3/\text{mm}^3$)*	148
Mieloblastos da MO %	5.1

*em sangue periférico.

As variáveis que obtiveram valores significativos demonstrando diferenças entre os mieloblastos e promielócitos normais são mostrados nas tabelas 6-8.

As variáveis da morfometria geométrica (tabela 6) estudadas que foram significativas: perímetro 8 ($p < 0.0005$), fator de forma ($p < 0.0005$) e desvio padrão do nível de cinza ($p = 0.04$). As variáveis da matriz de co-ocorrência (tabela 7) estudadas foram significativas para: entropia de Haralick ($p = 0.02$), inércia ($p < 0.005$), energia ($p < 0.005$), contraste ($p = 0.005$), momento diagonal ($p < 0.005$) e proeminência local ($p =$

0.01). As variáveis estudadas de dimensão fractal e Fourier (tabela 8) foram significativas para: $R^{2.45}$ Minkowski ($p = 0.007$), DF Fourier ($p = 0.006$) e Anel 1 ($p = 0.002$)

Tabela 6. Morfometria geométrica - casos normais

	Mieloblastos	Promielócitos	<i>p</i>
Área μ^2	111.9	112.7	0.75 (n.s.)
Perímetro 8	579	636	< 0.0005
Fator de forma	0.957	0.792	< 0.0005
Desvio padrão do nível de cinza	8.6	8.1	0.04

n.s. = não significativo

Tabela 7. Matriz de co-ocorrência – casos normais

	Mieloblastos	Promielócitos	<i>p</i>
Entropia de Haralick	7.90	7.77	0.02
Inércia	4.17	3.82	<0.005
Homogeneidade Local	0.535	0.538	0.51 (n.s.)
Energia	7177	6430	<0.005
Contraste	4.17	3.82	0.005
Momento Diagonal	19.1	17.7	<0.005
Proeminência local ($\times 10^{-5}$)	3.38	2.79	0.01

n.s. = não significativo

Tabela 8. Variáveis de dimensão fractal e Fourier – casos normais.

	Mieloblastos	Promielócitos	<i>p</i>
DF Minkowski**	2.134	2.128	0.08 (n.s.)
R ² 45 Minkowski	0.99647	0.99613	0.007
DF Fourier**	2.2128	2.2582	0.006
Anel 1	70631	36342	0.002

**DF=Dimensão Fractal; n.s. = não significativo

4.2 A análise dos casos SMD

A idade mediana dos pacientes com SMD foi de 64 anos (30 a 85 anos), sendo 16 homens e 14 mulheres (Tabela 9). Os valores obtidos para os núcleos de precursores granulocíticos de SMD são apresentados nas Tabelas 10-12. Segundo a classificação OMS, a maioria dos casos foi CRDM e AREB.

Na MO dos casos analisados, todas as variáveis estudadas apresentaram valores significativamente diferentes para blastos e promielócitos, exceto a área nuclear (tabelas 10-12). As variáveis que classificaram as células atípicas como intermediárias entre blastos e promielócitos foram: o perímetro 8 ($p < 0.0005$), o fator de forma ($p < 0.0005$), o desvio padrão do nível de cinza ($p = 0.01$), DF de Fourier ($p < 0.005$) e o Anel 1 ($p < 0.005$).

As variáveis que classificaram as células atípicas como promielócitos foram: a inércia ($p < 0.005$), a energia ($p < 0.005$), o contraste ($p < 0.005$), o momento diagonal ($p < 0.005$), a proeminência local ($p < 0.005$), DF ($p = 0.001$) e R² ($p = 0.06$) de Minkowski.

Precursosores atípicos granulocíticos apresentaram valores intermediários para 7 variáveis e foram semelhante à promielócitos de acordo com 7 variáveis. Exceto a área que não foi significativa. Nenhuma das características estudadas classificaram essas células atípicas como blastos. Esses achados foram independentes do tipo OMS.

Tabela 9. Média dos dados clínicos dos casos SMD

OMS	AR/ARSA	CRDM	AREB
Número de casos	4	15	11
Idade (anos)	64	64	62
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) *	4.7	3.6	3.1
Hemoglobina (g/dL)*	10,5	10,3	8,1
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)*	234	240	184
Blastos da MO %	2.0	1.0	8.0

*em sangue periférico.

Tabela 10. Morfometria geométrica – casos SMD

	Mieloblastos	Atípicos	Promielócito	<i>P</i>	Precursor mieloide atípico
Área μ^2	118.4	118.5	121.0	0.37	n.s.
Perímetro 8	598	628	656	<0.0005	Int.
Fator de forma	0.94	0.85	0.80	<0.0005	Int.
*Desv. p. Nível de cinza	9.1	8.4	8.1	0.01	Int.

*Desv. p. nível de cinza: Desvio Padrão do nível de cinza; n.s.: não significativo; int: intermediário.

A figura 6 demonstra a classificação das células atípicas pela análise do desvio padrão do nível de cinza. Neste caso o precursor mieloide atípico teve valores intermediários entre promielócitos e mieloblastos.

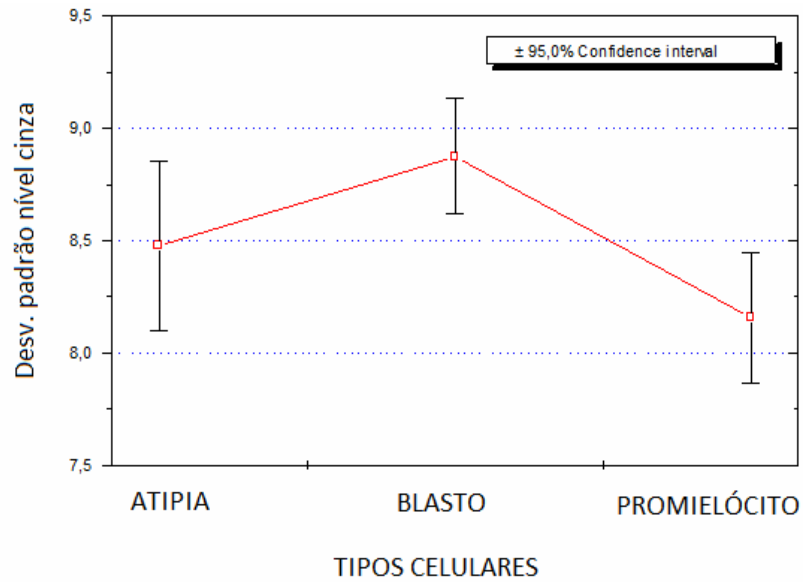


Figura 6: Classificação das células atípicas como intermediário segundo o desvio padrão do nível de cinza.

Tabela 11. Variáveis da matriz de co-ocorrência – casos SMD

	Mieloblastos	Atípicos	Promielócito	<i>p</i>	Precursor mieloide atípico
Entropia de Haralick	7.65	7.59	7.52	<0.005	Int.
Inércia	3.67	3.39	3.28	<0.005	Pro
Homogeneidade Local	0.553	0.555	0.558	<0.005	Int.
Energia	6749	5748	5595	<0.005	Pro
Contraste	3.67	3.39	3.28	<0.005	Pro
Momento Diagonal	17.4	16.1	15.6	<0.005	Pro
Proeminência local ($\times 10^{-5}$)	3.17	2.39	2.19	<0.005	Pro

Int: intermediário; Pro: promielócito

Segundo as variáveis da matriz de co-ocorrência, a entropia e a inércia mostraram para os precursores atípicos valores intermediários entre blastos e promielócitos. Todas as outras variáveis classificaram estas células como promielócitos.

As figuras 7 e 8 mostram a classificação das células atípicas pela análise da matriz de co-ocorrência utilizando as variáveis inércia e energia respectivamente. Neste caso as células atípicas foram classificadas como promielócitos.

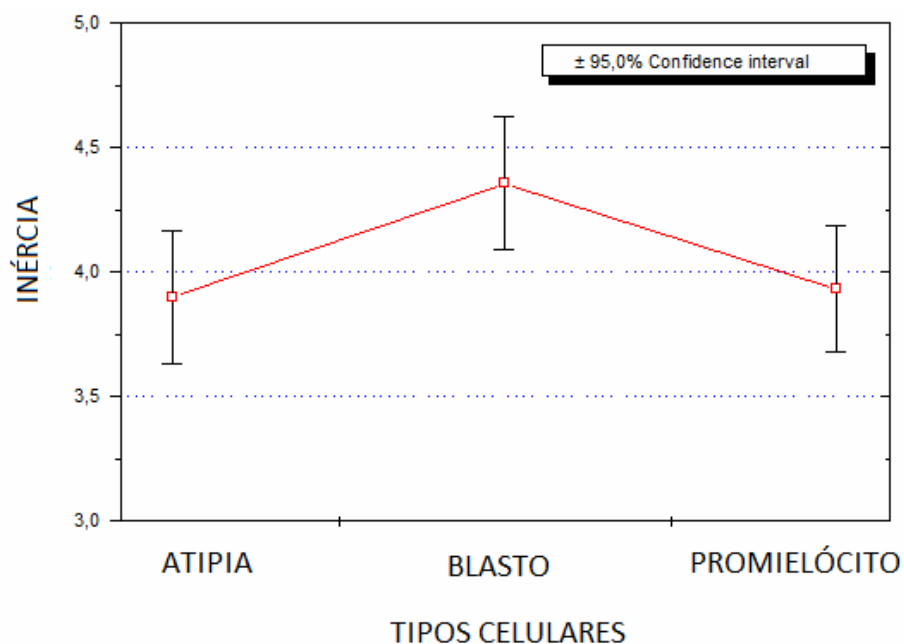


Figura 7: Classificação das células atípicas como promielócito segundo a inércia.

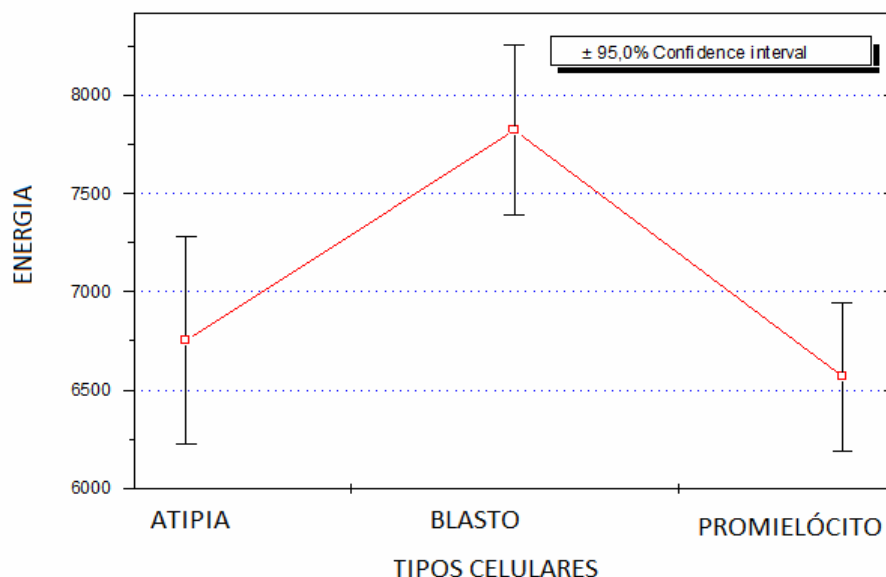


Figura 8: Classificação das células atípicas como promielócito segundo a energia.

Tabela 12: Variáveis de dimensão fractal e Fourier – casos SMD

	Mieloblastos	Atípicos	Promielócitos	<i>P</i>	Precursores mieloides atípicos
DF Minkowski **	2.122	2.118	2.118	0.001	Pro
R ² 45 Minkowski	0.99819	0.99807	0.99809	0.06	Pro
DF Fourier**	2.277	2.305	2.323	<0.005	Int.
Anel 1	70346	57174	42546	<0.005	Int.

** DF: dimensão fractal, Pro: promielócito, Int: intermediário

4.3 Comparação entre os mieloblastos normais e mieloblastos SMD

Comparados aos mieloblastos normais, os mieloblastos da SMD foram diferenciados por 8 variáveis (tabela 13) e apresentaram valores significativos segundo as variáveis: Entropia de Haralick ($p = 0.01$), inércia ($p = 0.05$), homogeneidade local ($p = 0.01$), contraste ($p = 0.05$), momento diagonal ($p = 0.05$), DF de Minkowski ($p = 0.01$), R² de Minkowski ($p < 0.005$) e DF Fourier ($p = 0.005$).

Tabela 13. Variáveis usadas na diferenciação de mieloblastos normais e dos casos de SMD

	Mieloblastos Normais	Mieloblastos SMD	<i>p</i>
Área μ^2	111.9	118.4	n.s.
Perímetro 8	579	598	n.s.
Fator de forma	0.957	0.94	n.s.
*Desv. p. Nível de cinza	8.6	9.1	n.s.
Entropia de Haralick	7.90	7.65	0.01
Inércia	4,17	3.67	0.05
Homogeneidade local	0.535	0.553	0.01
Energia	7177	6749	n.s.
Contraste	4.17	3.67	0.05
Momento Diagonal	19.1	17.4	0.05
Proeminência local ($\times 10^{-5}$)	3.38	3.17	n.s.
**DF Minkowski	2.134	2.122	0.01
R ² 45 Minkowski	0.99647	0.99819	<0.005
**DF Fourier	2.2128	2.277	0.005
Anel 1	70631	70346	n.s.

*Desv. p. nível de cinza: Desvio Padrão do nível de cinza; **DF: Dimensão Fractal; n.s.: não significativo

4.4 Comparação entre os promielócitos normais e promielócitos SMD

Os promielócitos da SMD comparados as células da SMD foram diferenciados por 9 variáveis (tabela 14) e apresentaram valores significativos segundo as variáveis: Entropia de Haralick ($p = 0.03$), inércia ($p = 0.01$), homogeneidade local ($p = 0.01$), energia ($p = 0.04$), contraste ($p = 0.01$), momento diagonal ($p = 0.02$), DF de Minkowski ($p = 0.03$), R² de Minkowski ($p = 0.001$) e DF Fourier ($p = 0.01$).

Tabela 14. Variáveis usadas na diferenciação de promielócitos normais de casos de SMD

	Promielócitos Normais	Promielócitos SMD	<i>p</i>
Área μ^2	112.7	121.0	n.s.
Perímetro 8	636	656	n.s.
Fator de forma	0.792	0.801	n.s.
*Desv. p. Nível de cinza	8.1	8.1	n.s.
Entropia de Haralick	7.77	7.52	0.03
Inércia	3.82	3.28	0.01
Homogeneidade local	0.538	0.558	0.01
Energia	6430	5595	0.04
Contraste	3.82	3.28	0.01
Momento Diagonal	17.7	15.6	0.02
Proeminência local ($\times 10^{-5}$)	2.79	3.17	n.s.
**DF Minkowski	2.128	2.118	0.03
R ² 45 Minkowski	0.99613	0.99809	0.001
**DF Fourier	2.2582	2.323	0.01
Anel 1	36342	42546	n.s.

*Desv. p. nível de cinza: Desvio Padrão do nível de cinza; **DF: Dimensão Fractal; n.s.: não significativo

Discussão

5. DISCUSSÃO

A análise de textura nuclear tem sido usada freqüentemente em patologia (17,18,28,29,34,37,38). Estes estudos permitiram analisar a diferenciação de tecidos normais, classificar neoplasias (16,18,30) e também estabelecer variáveis prognósticas (23,27,35). Além disso, Mello *et al* (39) usaram esse conceito de análise para avaliar mudanças na textura nuclear que reflete o remodelamento da cromatina de células em cultura após a incubação com agentes cancerígenos, comprovando que o 17- β -estradiol (E-2) pode provocar mudanças no conteúdo e na distribuição do DNA nuclear. Essas alterações são indicativas de transformação neoplásica.

A análise de imagem foi capaz de demonstrar mudanças nas características nucleares no carcinoma ductal *in situ* da mama, que tinham importância prognóstica (28). Estas análises morfométricas foram altamente sensíveis para detectar alterações submicroscópicas que não foram detectadas por especialistas utilizando microscopia de luz convencional.

O uso da análise de imagem nuclear computadorizada de diversos tecidos permitiu o diagnóstico diferencial entre lesões benignas (adenomas) e malignas (carcinomas) (28,19-21,24,40). Kortenhorst *et al* (22) usaram a análise da textura da cromatina para estudar a ação do ácido valpróico (AVP) no carcinoma de próstata *in vivo* e *in vitro*. O AVP é um inibidor da enzima histona desacetilase, altera a acetilação das histonas aumentando a apoptose em células malignas, e agindo desta maneira como droga antineoplásica, por efeito epigenético. O uso do AVP por um longo tempo causa alterações significativas na estrutura nuclear das células do câncer de próstata *in vitro* e também em xenoinxertos em camundongos, pelo aumento da acetilação das histonas. Essas alterações podem ser usadas para medir a resposta terapêutica. O tratamento com AVP também induz mudanças estruturais nucleares em hepatócitos e células renais em camundongos, onde os metabolitos são excretados. Essas mudanças são responsáveis pela hepatotoxicidade da droga.

Além do auxílio ao diagnóstico de células neoplásicas, a análise de textura nuclear em patologia, nos permite distinguir tumores benignos e malignos de cólon, mesotelioma e carcinomatose pleural ou entre diferentes carcinomas pulmonares, demonstrando o grau de

diferenciação da neoplasia (41). A aplicação dessa técnica em histologia e na citologia tem permitido avaliar o grau de diferenciação de neoplasias analisando progressivas mudanças na textura da cromatina (17,18,23,29,30,37-39) .

A dimensão fractal tem sido aplicada com sucesso para classificar tipos de neoplasias hematológicas pela citologia (32,43). A morfometria geométrica, derivadas da matriz de co-ocorrência e as características de Fourier têm ajudado a estabelecer variáveis prognósticas como, por exemplo, em neoplasias papilares uroteliais e carcinoma oral de células escamosas (44,45). Para a classificação de tipos de neoplasia como, por exemplo, o diagnóstico diferencial do carcinoma folicular da tireóide foi aplicado o estudo de textura nuclear baseada na dimensão fractal pelo método de Minkowski (20).

O uso da análise de imagem de textura nuclear em citologia de mama mostrou que a reposição hormonal com diferentes drogas pode induzir variado grau de mudanças na estrutura nuclear podendo, portanto ser útil no exame de pacientes e prever a ocorrência de alteração maligna (4). Utilizada também para identificar estágios de maturação nuclear, a análise de textura da cromatina é capaz de evidenciar anormalidades de estruturação reconhecendo rearranjos malignos demonstrados em estudos em outros tecidos, como por exemplo, o hematopoiético (16,25).

Em doenças hematológicas, por exemplo, as diferenças entre blastos linfóides de origem de células B e T, foram demonstradas pela análise de textura nuclear, provavelmente refletindo diferentes eventos moleculares associados com a diferenciação celular, padrão de metilação de genes e apoptose, específica de cada linhagem (16). Alterações epigenéticas são mais comuns que as anormalidades genéticas nas LMA e nas SMD e há uma interação entre elas (26). Eventos epigenéticos regulam a diferenciação celular levando a uma remodelação da cromatina. Esses fenômenos podem ser medidos pela análise da textura da cromatina nuclear, o que pode ser detectado por análise computacional de imagens (26,38,46)

Sabemos que na análise citológica do esfregaço de MO normal, os blastos e promielócitos apresentam características morfológicas bem definidas. Entretanto, nas SMDs há um assincronismo de maturação ocorrendo células precursoras atípicas, difíceis de classificar. Isto dificulta a quantificação do número de blastos na contagem do

mielograma. As alterações morfológicas encontradas nos precursores mielóides imaturos refletem as anormalidades da maturação celular.

Em nosso trabalho examinamos a utilidade da análise de textura da cromatina para a correta classificação dos precursores mielóides imaturos tanto normais como anormais encontrados nos esfregaços citológicos de MO normal e em pacientes com SMD.

Na medula óssea normal, a maioria das variáveis estudadas foi capaz de distinguir blastos de promielócitos. Portanto, podemos concluir que as variáveis usadas foram uma ferramenta útil para diferenciar precursores mielóides no início da maturação, como também observados em outros estudos de textura nuclear (23,27,30,35,36,41,43-45,47).

Nas SMDs alterações genéticas e epigenéticas causam alterações na proliferação, maturação e apoptose dos precursores hemopoiéticos (5,26,46,48) levando a um assincronismo de expressão de várias proteínas e a anormalidades na morfologia e a citometria de fluxo. Isto explica a dificuldades de classificar corretamente as células, mesmo por experts (24).

Após os nossos estudos morfométricos realizados, notamos que os precursores mielóides imaturos atípicos que não alcançaram consenso entre os dois observadores a microscopia comum. Na análise de imagens, eles apresentaram características nucleares de promielócitos em 7 das variáveis estudadas (inércia, energia, contraste, momento diagonal, a proeminência local, DF e R^2 Minkowski) ou intermediárias entre promielócitos e blastos em 7 variáveis. Isto demonstra as alterações neoplásicas ocorridas nas células. Também fala a favor deste fato, a detecção de diferenças entre blastos e promielócitos normais e das SMDs. Assim, o método usado no nosso trabalho também foi capaz de detectar a transformação maligna dos precursores mielóides.

Assim, vimos que a análise de imagem nos proporcionou um auxílio para a classificação de células mielóides imaturas. Utilizamos tanto as variáveis morfométricas clássicas como análise da textura de cromatina e aplicamos nas células da medula óssea normal e das SMDs e pudemos realizar a classificação dos precursores imaturos hematopoiéticos.

Podemos concluir que a análise de textura da cromatina em citologia de MO de rotina ajuda a definir as células que estão em estágios iniciais da diferenciação mielóide. As células classificadas como precursores mielóides atípicos no presente estudo, não revelaram

um aparelho de Golgi o que seria considerado um criterio morfologico para blastos. Portanto, concluimos que estas células atípicas podem ser blastos com maturacao anormal (assincronismo de maturacao ou promielócitos anômalos.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- ✓ A análise da textura de cromatina nuclear por análise de imagem computadorizada foi uma ferramenta útil para a classificação de células mielóides imaturas no esfregaço citológico de rotina da medula óssea.
- ✓ As variáveis mais úteis demonstradas em nosso trabalho para diferenciar as células atípicas e demonstrar as diferenças entre blastos e promielócitos normais e de SMD foram as variáveis da matriz de co-ocorrência: inércia, contraste, energia, momento diagonal e as variáveis da dimensão fractal como DF Minkowski e R^2 45.
- ✓ Estas células podem ser blastos com maturação anormal ou promielócitos atípicos.
- ✓ A análise de imagem computadorizada pode eliminar a análise subjetiva e futuramente ser aplicada a galerias de imagens digitais ou em telemedicina. Essa técnica também pode ser aplicada retrospectivamente a arquivos de lâminas.

Referências Bibliográficas

1. Lorand-Metze I. Síndrome mielodisplásicas. Conceito e classificação. Diagnóstico. Evolução e complicações. Tratamento. In: Zago MA; Falcão RP; Pasquini R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2001. P. 521-36. Cap.47.
2. Flores-Figueroa E, Espindola GG, Montesinos JJ, Trejo RMA, Mayani H. In vitro characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*. 2002 Jul; 26(7): 677-86.
3. Metzke K, Adam RL, Vido JR, *et al.* I. The influence of staining characteristics on nuclear texture features in cytology. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 31 (2009), 241-246
4. Serrano D, Gandini S, Mariani L *et al.* Computer-assisted image analysis of breast fine needle aspiration in a randomized chemoprevention trial of fenretinide vs. placebo in HRT users. *Breast* 2008; 17:91-97.
5. Valent P, Horny HP, Bennett JM *et al.* Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia Research* 2007; 31:727-39
6. Lorand-Metze I, Ribeiro E, Lima CSP, Batista LS, Metzke K. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leukemia Research*. 2007 Feb; 31(2):147-55.
7. Swerdlow SH, Camp E, Harris NL *et al.* WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008; 18-30.
8. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM *et al.* International scoring system for evaluation in MDS. *Blood*. 1997; 89:2079-88.
9. Kouides PA, Bennett JM. Morphology and classification of the Myelodysplastic Syndromes their pathologic variants. *Seminars in Hematology*. 1996; 33:95-100.
10. Haferlach T, Bacher U, Kern W *et al.* A comprehensive approach to the diagnosis of MDS after triage by morphology towards cytogenetics and other techniques. *Cancer Treat Rev*. 2007, doi: 10.1016/j.ctrv.2007.07.006.
11. Magalhães SMM, Lorand-Metze I, Síndromes mielodisplásicas – Protocolo de exclusão. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2004; 26(4):263-267.

12. Brunning RD, Orazi A, Germing U *et al.* Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues 4a edição ed. Lyon: IARC; 2008. P.88-93. Cap 5.
13. Vardiman JW, Brunning RD, Arber DA *et al.* Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. . In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues 4a edição ed. Lyon: IARC; 2008. P.18-30. Cap 1.
14. Niero-Melo L *et al.* Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São José do Rio Preto, v. 28, n. 3, Sept. 2006. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842006000300003&lng=en&nrm=iso. access on 30 Mar. 2011. doi: 10.1590/S1516-84842006000300003.
15. Goasguen JE, Bennett JM, Bain B *et al.* Large field of virtual microscopy as a tool for quality control and blast definitions in MDS and leukemia. From the International Working Group on MDS. Blood 2006; 108 (suppl 1):794-II.
16. Mello MRB, Metze K, Adam RA *et al.* Phenotypic subtypes of acute lymphoblastic leukemia associated with different nuclear chromatin texture. Anal Quant Cytol Histol 2008; 30:175-84
17. Ohshaki H, Hirakawa E, Kagawa K *et al.* Value of computer-assisted quantitative morphometry for differentiation of reactive renal tubular cells from low-grade urothelial carcinoma. Cytopathol 2010; 21:334-38.
18. Jondet M, Agoli-Agbo R, Dehennin L. Automatic measurement of epithelium differentiation and classification of cervical intraneoplasia by computerized image analysis. Diagn Pathol. 2010; 5:7
19. Dreyer T, Knoblauch I, Garner D *et al.* Specific changes of chromatin structure in nuclei of normal epithelium adjacent to laryngeal squamous cell carcinoma. Anal Quant Cytol Histol 2000; 20:141-50.

20. Ferreira RC, de Matos PS, Adam RL *et al.* Application of the Minkowski–Bouligand fractal dimension for the differential diagnosis of thyroid follicular neoplasias. *Cell Oncol* 2006; 28:331-33.
21. Nafe R, Yan B, Schlote W *et al.* Application of different methods for nuclear shape analysis with special reference to the differentiation of brain tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 2006; 28:69-77.
22. Kortenhorst MSQ, Isharwal S, Van Diest PJ *et al.* Valproic acid causes dose- and time-dependent changes in nuclear structure in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2009; 8:802-08
23. Bedin V, Adam RL, Sá BCS *et al.* Fractal dimension is an independent prognostic factor for survival in melanoma. *BMC Cancer* 2010; 10:260
24. Zini G, Bain B, Castoldi G, *et al.* European Leukemianet (ELN) project Diagnostic Platform (WP10): final results of the first study of the European Morphology Consensus Panel. *Blood*. 2008; 112, 1645
25. Adam RL, Silva RC, Pereira FG *et al* The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol* 2006; 28:55-59.
26. Melnick AM. Epigenetics in AML. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23:463-468
27. Metzke K. Fractal dimension of chromatin and cancer prognosis. *Epigenomics*, 2010; 2, 601-604.
28. Chapman JAW, Miller NA, Lickley HLA *et al.* Ductal carcinoma in situ of the breast with heterogeneity of nuclear grade: prognostic effects of quantitative nuclear assessment. *BMC Cancer* 2007; 7:174.
29. Sabo E, Beck AH, Montgomery EA *et al.* Computerized morphometry as an aid in determining the grade of dysplasia and progression to adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Lab Invest*. 2006; 86:1261-71.
30. Baak JP, Sniijders W, van Diermen B, *et al.* Prospective multicenter validation confirms the prognostic superiority of the endometrial carcinoma prognostic index in international Federation of gynecology and obstetrics stage 1 and 2 endometrial carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21:4214-4221.

31. Metze K, Adam RL. Quantification in histopathology-some pitfalls. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Reserch*. 2005; 38:141-143
32. Adam RL, Leite NJ, Metze K. Image Preprocessing Improves Fourier-Based Texture Analysis of Nuclear Chromatin. *Anal Quant Cytol Histol* 2008; 30:175-184.
33. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al* (Fab Cooperative Group) - Proposal for classification of the myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 1982; 51: 189-199.
34. Haralich RM, Shanmugam K, Dinstein I. Textural features for image classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 1973; 3:610-621.
35. Metze K, Lorand-Metze I, Leite NJ, *et al*. Goodness-of-fit of the fractal dimension as a prognostic factor. *Cell Oncol*. 2009; 31:503-504.
36. Metze K, Adam RL, Ferreira RC. Robust variables in texture analysis. *Pathology*. 2010; 42, 609-610.
37. Schmid K, Angerstein N, Geleff S *et al*. Quantitative nuclear texture features analysis confirms WHO classification 2004 for lung cancer. *Modern Pathol* 2006; 19:453-59.
38. De Capoa A, Febbo FR, Giovannelli F *et al*. Reduced levels of poly (ADP-ribose)ylation result in chromatin compaction and hypermethylation as shown by cell-by-cell computer-assisted quantitative analysis. *FASEB J* 1999; 13:89-93.
39. Mello MLS, Vidal BC, Russo IH *et al*. DNA content and chromatin texture of human breast epithelial cells transformed with 17-beta-estradiol and the estrogen antagonist ICI 182,780 as assessed by image analysis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2007; 617:1-7.
40. Frank DH, Davis JR, Ranger-Moore J *et al*. Karyometry of infiltrating breast lesions. *Anal Quant Cytol Histol* 2005; 27:195-01.
41. Kayser K, Hoshang SA, Metze K, *et al*. Texture and object-related automated information analysis in histological still images of various organs. *Anal. Quant. Cytol. Histol*. 2008; 30, 323-35.
42. Gupta S, Gupta R, Singh S *et al*. Nuclear morphometry and texture analysis of B-cell non-Hodgkin Lymphoma: utility in sub-classification on cytospreads. *Diagn Cytopathol* 2009; 38:94-03.

43. Mashiah A, Wolach O, Sandbank Uziel O, *et al.* Lymphoma and leukemia cells possess fractal dimensions that correlate with their biological features. *Acta Haematol.* 2008; 119:142-150.
44. Montironi R, Scarpelli M, Lopez-Beltran A, *et al.* Chromatin phenotype karyometry can predict recurrence in papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. *Cell Oncol.* 2007; 29:47-58.
45. Goutzanis L, Papadogeorgakis N, Pavlopoulos PM, *et al.* Nuclear fractal dimension as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral. Oncol.* 2008; 44: 345-353.
46. Reis-Alves SC, I Traina, Saad ST, *et al.* The impact of several phenotypic features at diagnosis on survival of patients with myelodysplastic syndromes. *Neoplasma* 2010; 57:530-536.
47. Metze K, Bedin V, Adam RL, *et al.* Parameters derived from the fast Fourier transform are predictive for the recurrence of basal cell carcinoma. *Cell. Oncol.* 2005; 127:137.
48. Ribeiro E, Lima CSP, Metze K, *et al.* Flow cytometric analysis of the expression of Fas/FasL in bone marrow CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: relation to disease progression. *Leuk. & Lymph.* 2004; 45:309-313.