

JACQUELINE SPACAGNA NICOLSI

**ANGIOGÊNESE EM TUMORES EPITELIAIS DE OVÁRIO:
estudo de variáveis metodológicas**

CAMPINAS

Unicamp

2010

JACQUELINE SPACAGNA NICOLSI

**ANGIOGÊNESE EM TUMORES EPITELIAIS DE OVÁRIO:
estudo de variáveis metodológicas**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Anatomia Patológica

Orientador: Prof. Dr. André Almeida Schenka

CAMPINAS

Unicamp

2010

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

Bibliotecário: Rosana Evangelista Poderoso - CRB-8ª / 6652

N547a Nicolosi, Jacqueline Spacagna
Angiogênese em tumores epiteliais de ovário: estudo de
variáveis metodológicas / Jacqueline Spacagna Nicolosi.
Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: André Almeida Schenka
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ovário. 2. Ovários - Câncer. 3. Morfometria.
I. Schenka, André Almeida. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Angiogenesis in ovarian epithelial neoplasms: study of
methodological variables**

Keywords: • Ovarian
• Ovarian-Cancer
• Morphometry

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Área de Concentração: Anatomia Patológica

Banca examinadora:

Prof. Dr. André Almeida Schenka

Prof^a. Dr^a. Glauce Aparecida Pinto

Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha

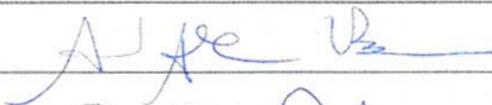
Data da defesa: 17-12-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Jacqueline Spacagna Nicolosi de Araújo

Orientador(a): Prof. Dr. Andre Almeida Schenka

Membros:

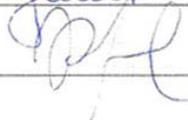
1. Prof. Dr. Andre Almeida Schenka -



2. Profª. Dra. Glauce Aparecida Pinto -



3. Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha -



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

Data: 17/12/2010

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. André, pela orientação.

Às Dras. Adriana Yoshida, Sophie Derchain e Liliana, pela imensa generosidade em compartilhar recursos fundamentais à concretização do presente trabalho.

À Dra. Natália e Dra. Julia, pela compreensão e pela disponibilidade de conciliação entre as horas dedicadas ao laboratório e aquelas dedicadas à dissertação.

À Dra. Cleide Aparecida Moreira Silva, pelo fundamental auxílio na estatística do trabalho.

Ao Professor Steiner, cujas aulas foram de fundamental aprendizado.

Ao Professor José Vassallo, grande mentor de jovens mentores...

Às secretárias Maria do Carmo, Marcinha e Salete, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela infinita paciência, compreensão e inestimável apoio.

Ao Leandro, incentivador, quem acreditou muito mais do que eu na concretização desse trabalho!

Aos meus pais e minha irmã, pela torcida.

Ao Professor Junqueira (*in memoriam*), querido professor, que me apresentou um universo de conhecimento, sabedoria, trabalho, talento e persistência.

Ao Sr. Luiz Fransen, querido professor e incentivador.

A Deus,
eu agradeço pelo fundamental sustento!

*“Imagine there's no heaven
It's easy if you try
No hell below us
Above us only sky
Imagine all the people
Living for today”*

Jonh Lennon

RESUMO

Em neoplasias malignas, a angiogênese parece favorecer não só o crescimento celular como a disseminação sistêmica, tendo, potencialmente, valor diagnóstico, prognóstico e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Contudo, que este papel é variável de um tumor para outro, o que provavelmente reflete diferenças biológicas entre as neoplasias e limitações ou variações metodológicas dos estudos realizados. Nas neoplasias ovarianas, devido à escassez de trabalhos e grande variabilidade metodológica destes, o papel da angiogênese ainda não está estabelecido. Objetivos: **(1)** avaliar a influência de diferentes variáveis metodológicas na quantificação da angiogênese em tumores ovarianos; **(2)** estabelecer funções matemáticas para a conversão de resultados obtidos com variantes metodológicas. Metodologia: em tumores ovarianos diagnosticados no CAISM-Unicamp entre 1997 a 2003, a vascularização identificada por meio imunocoloração foi quantificada através da determinação de densidade microvascular e área endotelial. Foram avaliadas comparativamente as variantes metodológicas: formato de imagem (TIFF vs. JPEG) e número de campos de análise (1, 3, 5, 10, 15 e 20 campos de médio aumento) Resultados e conclusões: O impacto do formato de imagem sobre a quantificação vascular em tumores epiteliais ovarianos pode ser considerada pequena, já que a concordância entre imagens TIFF e JPEG é elevada ($ICC > 0,75$). Constitui exceção o contraste TIFF vs. JPEGs de baixa qualidade, na variável densidade microvascular automática. Nesse caso, a interconversão de valores pode ser realizada através de funções de correção. Finalmente, no universo amostral avaliado, não foi possível caracterizar uma curva com platô de estabilização que permitisse a estimativa de N mínimo de campos capaz de garantir uma análise fidedigna de angiogênese em tumores ovarianos epiteliais.

ABSTRACT

In malignant neoplasms, angiogenesis seems to facilitate tumour growth and metastasis, thus, bearing a potential role in diagnostic/prognostic assessment, as well as in the development of new therapeutic strategies. However, the relative importance of such a role is variable from one entity to another, probably reflecting biological differences between tumours, as well as limitations or methodological variations among studies. In ovarian neoplasms, due to paucity of studies and great methodological variability among them, the role of angiogenesis is yet to be established. The present study aims: **(1)** to evaluate the influence of different methodological variables on angiogenesis quantitation in ovarian tumours and **(2)** to establish, by linear regression, functions that may be used to interconvert values obtained from different methodological variants. Methods: using ovarian tumours diagnosed in our Academic Women's Hospital (CAISM-Unicamp) from 1997-2003, tumour-related vascularity was detected by CD34 immunostaining and quantified by assessment of microvessel density and endothelial. Furthermore, the following methodological variants were tested: image file format (TIFF vs. JPEG), and total number of analyzed fields (1, 3, 5, 10 and 20 medium-power fields). Results and conclusions: the impact of image format over vascular quantitation was considered small, since the agreement between TIFF and JPEG was found to be high ($ICC > 0,75$). The only exception was represented by the contrast TIFF vs. low quality JPEGs in automatic microvessel density assessments. Even in these cases, interconversion could be achieved using prediction models developed in this study. As for the second objective of the study, given the sampling universe used, we could not properly characterize a stabilization plateau curve which could allow for extrapolation of the minimum number of analysis fields (as required for an accurate morphometric analysis of angiogenesis in ovarian epithelial tumors).

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS:	André Almeida Schenka
AEnd%:	área endotelial percentual
AEndM:	área endotelial média
AEndT:	área endotelial total
ICC:	índice de correlação intraclasses
JSN:	Jacqueline Spacagna Nicolosi
MVD:	densidade microvascular
MVDa:	densidade microvascular automática
MVDm:	densidade microvascular manual
RGB:	red-green-blue
TVA:	área microvascular total

	Pág.
Tabela 1: Coeficiente de correlação intraclassas (ICC) em medida única para imagens TIFF x JPEG.....	46
Tabela 2: Resultados da regressão linear para obtenção do modelo de conversão de JPEGlow para TIFF na variável MVDa.....	49
Tabela 3: Casos “outliers” JPEGlow para TIFF na variável MVDa.....	49
Tabela 4: Resultados da regressão linear para obtenção do modelo de conversão de JPEGlow para TIFF na variável MVDa, após eliminação dos outliers.....	50
Tabela 5: Resultados da regressão linear para obtenção do modelo de conversão de JPEGbasic para TIFF na variável MVDa....	52
Tabela 6: Resultados da regressão linear para obtenção do modelo de conversão de JPEGhigh para TIFF na variável AEndm...	53
Tabela 7: Caso “outlier” JPEGhigh para TIFF na variável AEndm.....	54
Tabela 8: Resultados da regressão linear para obtenção do modelo de conversão de JPEGlow para TIFF na variável AEndm.....	55
Tabela 9: Análise descritiva e comparação da medida área endotelial média (AEnd média) entre grupos de neoplasias e numero de campos (N=24).....	61

Tabela 10: Análise descritiva e comparação da medida área endotelial total (AEndt) entre grupos de neoplasias e numero de campos (N=24).....	63
Tabela 11: Análise descritiva e comparação da medida área endotelial percentual (AEnd%) entre grupos de neoplasias e numero de campos (N=24).....	65
Tabela 12: Análise descritiva e comparação da medida densidade de microvasos manual (MVDm) entre grupos de neoplasias e numero de campos (N=24).....	67
Tabela 13: Análise descritiva e comparação da medida densidade de microvasos manual (MVDm) entre grupos de neoplasias e numero de campos (N=24).....	69
Tabela 14: Coeficientes de variação no grupo de tumores mucinosos e número de campos.....	71
Tabela 15: Coeficientes de variação no grupo de tumores serosos e número de campos.....	72

	Pág.
Figura 1: Fluxograma de obtenção dos diferentes formatos de imagem.....	37
Figura 2: Imagens ilustrativas do procedimento de segmentação semiautomática de estruturas vasculares no programa de análise de imagem Imagelab (v. 2.4).....	39
Figura 3: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão do marcador CD34 nos diferentes formatos de image50m utilizados no trabalho. Immunoperoxidase, 100X (aumen51to original).....	45
Figura 4: Dispersão das medidas de MVD automático entre os tipos de imagem TIFF e JPEGlow (ICC= 0,606).....	48
Figura 5: Gráfico de resíduos (TIFFxJPEGlow - MVDAutomático). Setas: “outliers”.....	50
Figura 6: Dispersão das medidas de MVD automático entre os tipos de imagem TIFF e JPEGbasic (ICC= 0,733).....	51
Figura 7: Gráfico de resíduos (TIFFxJPEGbasic - MVDAutomático)...	53
Figura 8: Dispersão das medidas AEnd média entre os tipos de imagem (TIFFxJPEGhigh).....	54
Figura 9: Dispersão das medidas AENDmédia entre os tipos de imagem (TIFFxJPEGlow).....	56

Figura 10:	Dispersão das medidas de AEND total entre os tipos de imagem (TIFFxJPEGhigh) com ICC excluindo o caso 13 = 0.953 IC95% (0.927, 0.969).....	57
Figura 11:	Dispersão das medidas de AEND total entre os tipos de imagem (TIFFxJPEGlow) com ICC excluindo o caso 13 = 0.951 IC95% (0.922, 0.969).....	58
Figura 12:	Dispersão das medidas de AEND total entre os tipos de imagem (TIFFxJPEGbasic) com ICC excluindo os casos 13 e 28 = 0.921 IC95% (0.879, 0.949).....	59
Figura 13:	Valores médios e desvios padrão para cada conjunto de campos e grupo (tipo histológico de neoplasia), para a variável AEnd media.....	62
Figura 14:	Valores médios e desvios padrão para cada conjunto de campos e grupo (tipo histológico de neoplasia), para a variável AEnd total.....	64
Figura 15:	Valores médios e desvios padrão para cada conjunto de campos e grupo (tipo histológico de neoplasia), para a variável AEnd%.....	66
Figura 16:	Valores médios e desvios padrão para cada conjunto de campos e grupo (tipo histológico de neoplasia), para a variável MVDm.....	68
Figura 17:	Valores médios e desvios padrão para cada conjunto de campos e grupo (tipo histológico de neoplasia), para a variável MVDa.....	70

	Pág.
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1- INTRODUÇÃO	18
2- JUSTIFICATIVA	27
3- OBJETIVOS	30
3.1- Gerais	31
3.2- Específicos	31
3.2.1- Avaliar quantitativamente a influência da variável “formato de armazenamento de imagem” na quantificação de angiogênese.....	31
3.2.2- Avaliar quantitativamente o impacto da variável “número total de campos analisados” na quantificação de angiogênese.....	32
4- MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1- Pacientes e espécimes anatomopatológicos	34
4.2- Técnica imunoistoquímica	34
4.3- Seleção de campos, captura e armazenamento de dados	36

4.3.1- Equipamento.....	36
4.3.2- Seleção e captura de campos para os estudos comparativos entre formatos de imagem.....	36
4.3.3- Seleção e captura de campos para os estudos comparativos entre conjuntos de campos avaliados por caso.....	37
4.4- Análise quantitativa da angiogênese (parâmetros de quantificação vascular).....	38
4.5- Análise estatística.....	40
4.6- Reprodutibilidade interobservador (fidedignidade da análise).....	40
5- ASPECTOS ÉTICOS.....	41
6- RESULTADOS.....	43
6.1- Primeira parte - Influência do formato de imagem sobre valores de quantificação microvascular.....	44
6.1.1- Apresentação dos modelos de predição desenvolvidos em casos de ICC<0,75 através de regressão linear simples.....	48
i) TIFF x JPEGlow para MVD automático (ICC= 0,606)....	48
ii) TIFF x JPEGbasic para MVD automático (ICC= 0,733).....	51
iii) TIFF x JPEGhigh para AEnd média (ICC= 0,687).....	53
iv) TIFF x JPEGlow para AEnd média (ICC= 0,648).....	55

v) Análises da relação entre imagens JPEG e TIFF para a medida AEnd total, após a exclusão de casos “outliers” (Figuras 10, 11 e 12).....	57
6.1.2- Síntese das análises de regressão linear em casos onde, inicialmente, o ICC era menor que 0,8.....	60
6.2- Segunda parte - Influência do formato de imagem sobre valores de quantificação microvascular.....	60
7- DISCUSSÃO.....	73
7.1- Influência do formato de imagem.....	74
7.2- Influência do número total de campos.....	75
8- CONCLUSÕES.....	78
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1- INTRODUÇÃO

Os carcinomas ovarianos estão entre as neoplasias malignas mais freqüentes do sistema genital feminino, em países ocidentais desenvolvidos. Além de prevalentes, estes tumores figuram entre as neoplasias ginecológicas mais letais, sendo a quinta causa de morte em mulheres¹. Devido à escassez de sintomas, a evolução insidiosa e a falta de métodos diagnósticos de triagem em larga escala, a maioria das pacientes chega à atenção médica já em estágio avançado, sendo a taxa média de sobrevida em 5 anos de aproximadamente 20%². Atualmente, o câncer epitelial de ovário representa a neoplasia maligna do trato genital feminino de pior prognóstico, respondendo por cerca de metade dos óbitos por câncer ginecológico³. Frente a este insucesso diagnóstico e terapêutico, tornam-se necessários estudos que contribuam para um melhor entendimento sobre a fisiopatogênese destes tumores. Em particular, seriam de grande valor informações que permitissem o descobrimento/desenvolvimento de novos parâmetros diagnósticos e de estratificação prognóstica, bem como de novas estratégias terapêuticas. Neste sentido, o estudo da angiogênese destaca-se como uma das linhas de pesquisa mais promissoras em tumores de ovário.

A angiogênese pode ser conceituada como a formação de novos vasos a partir de células endoteliais maduras oriundas de um leito vascular pré-existente⁴⁻¹⁰, sendo o principal mecanismo de neoformação vascular durante a vida pós-natal^{11,12,13}. A angiogênese ocorre tanto em processos fisiológicos (e.g., modificações cíclicas do ovário, reparo tissular auto-limitado, etc.), quanto em condições patológicas (e.g., inflamações crônicas, doenças metabólicas, e processos neoplásicos benignos e malignos)^{4-7,9-11,14,15}. Postula-se que, quanto maior a proliferação de um tecido neoplásico, maiores seriam suas necessidades metabólicas e, conseqüentemente, mais expressivo o grau de neoangiogênese¹⁶. Sendo os tumores malignos geralmente de crescimento mais rápido que os benignos, poder-se-ia prever também uma maior vascularização naqueles do que nestes¹⁶. Pela mesma analogia, considerando-se apenas as malignidades, poderíamos supor que os tumores mais agressivos (de crescimento mais acelerado) também apresentariam índices de angiogênese maiores. Ainda em relação às neoplasias malignas, um aumento na vascularização poderia,

em tese, favorecer sua entrada na circulação sanguínea e, conseqüentemente, sua disseminação sistêmica (metastatização). Em conjunto, estas suposições, se confirmadas, teriam grande impacto diagnóstico (i.e., no diagnóstico diferencial entre entidades benignas e malignas (quando morfológicamente semelhantes)), prognóstico (suplantando ou complementando outros fatores estabelecidos em neoplasias malignas e de malignidade limítrofe - tumores “borderline”) e terapêutico (principalmente, na indicação de estratégias de tratamento baseadas em agentes anti-angiogênicos). Apesar de testadas exaustivamente em inúmeros tumores nas últimas décadas, estas hipóteses foram apenas parcialmente confirmadas¹⁷.

Em algumas neoplasias, como os carcinomas ductais de mama, as suposições acima delineadas foram confirmadas pela maioria dos autores¹⁷. Em particular, pôde-se estabelecer uma relação concordante entre angiogênese aumentada, maior risco de metástase e, conseqüentemente, pior prognóstico. Todavia, em tumores como ovário, cólon e pulmão, muitas discrepâncias de resultado foram observadas, tanto no diagnóstico de malignidade/progressão tumoral, quanto no estabelecimento de prognóstico¹⁷. Para alguns autores, é possível que a importância da angiogênese seja variável de um tumor para outro, refletindo diferenças biológicas relacionadas à histogênese do tumor (tipo de tecido ou linhagem que o origina) e/ou a propriedades intrínsecas da entidade analisada^{10,17}. Para muitos, todavia, as diferenças entre os vários tumores assim como as controvérsias entre estudos relacionados a um mesmo tumor parecem nascer fundamentalmente de inúmeros problemas e variações metodológicos^{10,17}. Na ausência ou paucidade de estudos prospectivos e retrospectivos com grandes casuísticas, esta controvérsia persiste até os dias de hoje, comprometendo a evolução do conhecimento acerca da angiogênese tumoral, no que toca sua importância fisiopatológica e terapêutica.

Diferentes métodos de mensuração podem ser utilizados na avaliação da angiogênese tumoral. Do ponto de vista histomorfológico, a angiogênese neoplásica pode ser estudada por meio de duas abordagens principais:

(1) através da análise de aspectos quantitativos (morfométricos) dos vasos neoformados e (2) através do estudo de substâncias pró- e anti-angiogênicas, em nível gênico ou, mais comumente, de expressão protéica. Do ponto de vista quantitativo, a primeira abordagem - considerada a forma mais direta de se avaliar o grau de vascularização de um tumor - consiste em dois parâmetros principais: a densidade microvascular (MVD, em inglês) e a área microvascular total (TVA, em inglês)^{16,17,18,19,20,21,22,23}.

A MVD é o método de quantificação de angiogênese mais utilizado na literatura^{17,19,21,22}. Pode ser definida como um valor médio de contagem de vasos, obtido através de uma metodologia historicamente pouco consensual, isto é, variável de estudo para estudo. Na maioria dos estudos, são contadas estruturas microvasculares intra-tumorais em áreas de maior concentração vascular (“hotspots”), fora de áreas escleróticas ou de necrose^{17,19,21,22}. Define-se como “microvaso”, qualquer estrutura vascular, representada em secção transversal, longitudinal ou tangencial, que se apresente nitidamente separada de outras estruturas semelhantes^{17,19,21,22}. De acordo com esta norma, dois ou mais microvasos adjacentes (e não contíguos no corte histológico analisado) devem ser contabilizados como estruturas separadas, mesmo que na realidade correspondam a segmentos de único vaso tortuoso que “corta” o plano de secção histológica mais de uma vez. Além disso, para ser considerada como um microvaso, a estrutura em questão não pode apresentar parede muscular²². Não é necessário apresentar lúmen no corte histológico avaliado. Contudo, estando presente, não há critérios bem estabelecidos que definam seu diâmetro máximo. Alguns estudos propõem um diâmetro máximo de 350µm (ou o equivalente a cerca 50 hemácias enfileiradas), outros simplesmente não definem qualquer limite^{22,24}. Outro ponto de controvérsia diz respeito ao número de campos analisados e ao diâmetro de campo/objetiva utilizados para tanto. Na literatura, o número de áreas analisadas variou de 2 a 5, enquanto o diâmetro de campo variou de 0,3mm² a 1,452mm²^{17,19,21,22}.

Também variaram os métodos de identificação das células endoteliais. Nos estudos iniciais, a vasculatura era avaliada morfológicamente em cortes histológicos corados em HE. Com o advento da imunoistoquímica, vários marcadores têm sido utilizados para revelar os microvasos^{17,19,21,22}. Dentre os marcadores mais comumente empregados, destacam-se: o antígeno relacionado ao fator VIII (fator de Von Willebrand), o CD34 e a molécula CD31/PECAM-1. Estes marcadores são chamados em conjunto de “pan-endoteliais”¹⁷. Em paralelo, outra classe de marcadores vasculares mais recentemente descrita é a dos marcadores de “endotélio ativado e/ou em proliferação”, sendo o representante mais conhecido o CD105 (endoglina). Cada marcador apresenta suas vantagens e limitações próprias. Devido à escassez de estudos comparando formalmente os diferentes marcadores disponíveis, não há concordância na literatura quanto ao marcador ideal²². Mesmo na ausência de evidências científicas a indicar qual deles seria o marcador ideal, recentemente, dois consensos internacionais sobre metodologia em avaliação de angiogênese, expressando a opinião de pesquisadores renomados nesta área, recomendaram a utilização do CD34^{19,25}. Em nossa experiência prévia com carcinomas do colo uterino, o CD34 mostrou-se mais reprodutível e fidedigno, quanto comparado a outros marcadores²⁶.

Como mencionado acima, acredita-se que a falta de padronização metodológica na quantificação da angiogênese possa estar implicada nas discrepâncias de resultados encontradas na vasta literatura sobre angiogênese tumoral. Com o intuito de superar alguns destes problemas, um consenso internacional sobre metodologia e critérios para a avaliação da MVD foi organizado²⁵ e posteriormente atualizado¹⁹. Em conjunto, estes dois relatórios propuseram um método padrão para a avaliação da MVD e estabeleceram padrões de controle de qualidade direcionados ao aprimoramento da reprodutibilidade entre centros de estudo. De forma complementar, Sharma et al.²² recomendaram a utilização de critérios e métodos estabelecidos de modo consensual, bem como a explicitação dos mesmos no corpo dos artigos a fim de facilitar o seu uso em larga escala tanto na prática clínico-patológica quanto na

pesquisa em angiogênese. Um programa de treinamento para morfologistas inexperientes também seria desejável dada à subjetividade inerente à metodologia de seleção de “hotspots” e de identificação de microvasos individuais. Finalmente, cumpre lembrar que, apesar de terem sido enunciados arbitrariamente como “Consenso”, os relatórios mencionados acima ainda não gozam desta prerrogativa na prática, pelo menos não no que tange a literatura em tumores de ovário.

A principal aplicação prática da MVD tem sido sua utilização como fator preditivo de crescimento tumoral agressivo, potencial metastático e, conseqüentemente, de sobrevida²⁷. Weidner et al.²⁸ demonstraram que a MVD em mulheres com carcinoma ductal invasor da mama é um fator preditivo independente para comportamento agressivo. Estes autores encontraram um aumento no risco de metástase de 1,17x para cada aumento de 10 vasos no MVD. A maioria dos estudos subsequentes mostrou uma correlação entre MVD e vários parâmetros prognósticos^{22,29}, sendo a MVD um preditor significativo para recidiva local, sobrevida geral e livre de doença, em pacientes com câncer de mama sem metástases linfonodais¹⁸. Em trabalho realizado recentemente pelo nosso grupo²⁶, utilizando lesões escamosas do colo uterino, demonstrou-se uma associação importante entre alta vascularização, de um lado, e presença de invasão ou menor grau de diferenciação, de outro.

A área microvascular total (TVA) pode ser definida como a área ocupada por microvasos por unidade de área de tumor, obtida com a utilização de um microscópio dotado de objetiva (com aumento específico e diâmetro de campo conhecidos), em um número limitado de campos (geralmente, 3 ou 4), subjetivamente selecionados em áreas de maior vascularização (“hotspots”)²². O método “Chalkley” representa um dos métodos mais utilizados para se estimar indiretamente a TVA, ao mesmo tempo em que também fornece uma estimativa de número de elementos vasculares (como a MVD). Resumidamente, segundo este método, uma ocular quadriculada, contendo 25 pontos de intersecção (a chamada “gratícula de Chalkley”) é aplicada sobre cada campo de “hotspot” e

ajustada para que o maior número possível de pontos coincidam com os microvasos. A média de 3 contagens assim obtidas é o valor final de Chalkley²². O valor prognóstico da área microvascular total (TVA) tem sido enfatizada de maneira freqüente em inúmeros estudos. Além da contagem de Chalkley, uma outra maneira de se quantificar a área microvascular é por análise de imagem (morfometria). Da mesma forma que na determinação da MVD, inicialmente os estudos de TVA envolviam lâminas histológicas coradas em H&E. Mais recentemente, a TVA tem sido obtida em lâminas coradas para marcadores vasculares pelo método imunoistoquímico²².

Além das variações morfológicas e de significado biológico que a angiogênese pode assumir na dependência do tecido tumoral ou órgão em que se desenvolve, cumpre lembrar as dificuldades metodológicas na quantificação da angiogênese que podem decorrer destas variações tecido-específicas. Nesse sentido, os tumores epiteliais de ovário constituem-se em exemplo emblemático. Enquanto os tumores de mama são habitualmente sólidos, os tumores de ovário freqüentemente são mais complexos arquiteturalmente, exibindo áreas císticas e papilíferas³⁰. No interior dos espaços císticos, i.e., no espaço livre entre as papilas, têm-se áreas sem qualquer tecido (espaços vazios) que, a priori, não poderiam ser contabilizadas como áreas negativas, o que muito dificulta a padronização/normalização das contagens. Trata-se de um problema teórico-metodológico de identificação quase imediata quando se tenta reproduzir os protocolos de quantificação de angiogênese descritos na literatura, mas que raramente é discutido ou sequer mencionado^{30,31}. É importante destacar que, apesar do grande número de trabalhos na literatura sobre angiogênese em tumores, o conhecimento acumulado ainda é insuficiente para generalizações amplas. A angiogênese depende em grande parte de fatores e características próprias do microambiente em que se processa, sendo, portanto um processo tecido-específico. Desse modo, é prudente que o conhecimento adquirido a partir da experiência prévia com um determinado órgão ou tumor seja investigado, testado e validado em outros tecidos de interesse.

Utilizando os termos de busca “angiogenesis”, “ovary” e “cancer”, uma pesquisa na base de dados “Medline” (realizada em março de 2009 pelos autores deste projeto) retornou 369 artigos, dos quais apenas 28 incluíam algum tipo de quantificação histomorfológica direta da vascularização tumoral^{3,16,24,30-44,47-53}. Não bastasse a paucidade de artigos envolvendo quantificação histomorfológica de vasos em carcinomas ovarianos, observam-se a partir da leitura destes trabalhos inúmeros pontos de controvérsia. Dos 28 trabalhos assinalados, 21 abordaram a relação entre angiogênese tumoral e prognóstico, enquanto 15 discutiram questões relacionadas ao diagnóstico histológico (isto é, características histológicas indicativas de comportamento, tipo histológico e grau histológico da neoplasia). Houve, portanto, trabalhos que abordaram tanto aspectos prognósticos quanto diagnósticos. Dos 21 trabalhos que abordaram questões prognósticas, 13 confirmaram a tendência da literatura em atribuir à angiogênese um valor preditivo sombrio, enquanto 8 não detectaram qualquer correlação ou (surpreendentemente) foram favoráveis a uma correlação com melhor prognóstico^{3,16,30,31,32,37-44,46-53}. Com relação a questões diagnósticas (dados morfológicos), dos 15 trabalhos compilados, apenas 7 avaliaram a relação entre angiogênese e características histológicas indicativas de comportamento^{24,33-35,40}, verificando-se em 4 destes artigos uma correlação direta com o diagnóstico de malignidade^{33-35,40}. Nos outros três trabalhos, a correlação foi inversa (lesões mais benignas seriam mais vascularizadas; 2 trabalhos)^{24,31} ou inexistente⁴⁵. Ainda, dentre os 15 artigos analisados, pouco mais da metade (8 trabalhos) estudou a relação entre angiogênese com grau histológico de diferenciação^{30,37,39,40,42,45,52}. Destes, apenas 2 mostraram alguma correlação, sendo, contudo, divergentes nas conclusões: enquanto um mostrou correlação com maior grau histológico⁴², o outro apresentou o inverso⁴⁵. Finalmente, 6 trabalhos quantificaram a angiogênese segundo o tipo histológico de tumor. A metade (três) destes trabalhos mostrou alguma correlação, ao contrastar subtipos de carcinoma ovariano^{32,35} ou carcinomas de ovário vs. de mama³⁰.

Nos dois que estudaram os principais subtipos histológicos das neoplasias epiteliais malignas do ovário, observou-se concordância quanto à idéia de que os tumores mucinosos seriam os de maior grau de vascularização^{32,35}.

Dado que pelo menos parte destas dissonâncias poderia ter-se originado em problemas no método de quantificação da angiogênese, vale à pena delinear também as principais características metodológicas destes 28 trabalhos compilados. Resumidamente, observou-se que a grande maioria dos trabalhos (27/28) utilizou como parâmetro de quantificação a MVD. Apenas um trabalho utilizou uma variável de área vascular, através da determinação semi-automática da área de marcação endotelial¹⁶. O marcador endotelial mais utilizado foi o CD34 (16/28 trabalhos), seguido pelo Fator de Von Willebrand (8/28 trabalhos). Apenas 3 trabalhos avaliaram comparativamente mais de um marcador endotelial^{35,37,53}. Um único trabalho, de casuística modesta (N= 58), utilizou o marcador de endotélio neoformado CD105, comparando-o com o CD31⁵³. Curiosamente, na análise multivariada, apenas com o CD105 foi possível detectar correlação entre MVD e pior prognóstico (menor grau de ressecabilidade).

Finalmente, pode-se questionar a validade técnica da maioria destes 28 trabalhos, uma vez que um total de 25 utilizou método subjetivo e/ou manual de quantificação de vasos. Apenas 3 trabalhos introduziram algum grau de automatização^{16,24,51}, visando melhorar a objetividade e a reprodutibilidade dos resultados. Destes, 2 concordaram no conceito de que a angiogênese seria um fator preditivo de melhor evolução clínica^{24,51}, enquanto o terceiro defendeu o oposto¹⁶. É possível que as diferenças de opinião entre estes trabalhos sejam decorrentes de diferenças na variável de quantificação de angiogênese. Os trabalhos que propõem o grau de neoangiogênese como um fator relacionado a bom prognóstico utilizaram métodos semi-automáticos de quantificação da MVD^{24,51}. Já o trabalho que associa maior vascularização com pior prognóstico é o único na Literatura de angiogênese em tumores de ovário a utilizar uma medida indireta de área vascular total, a área endotelial total¹⁶.

2- JUSTIFICATIVA

A partir do exposto nos parágrafos anteriores, pode-se concluir que a literatura sobre quantificação de angiogênese em carcinomas ovarianos ainda é escassa e extremamente controversa, não sendo possível estabelecer o real papel da quantificação da angiogênese como parâmetro de valor diagnóstico, prognóstico ou preditivo terapêutico. É possível que as diferenças de resultado entre os estudos tenham sido ocasionadas por limitações metodológicas (subjetividade dos métodos manuais, disponibilidade restrita de marcadores vasculares) ou pela simples variação metodológica entre estudos (definições ou escolhas metodológicas aleatórias ou arbitrárias). Além disso, poucos trabalhos de angiogênese em neoplasias ovarianas utilizaram técnicas automatizadas/semi-automatizadas de quantificação vascular, isto é, adjuntos metodológicos que poderiam melhorar desde a reprodutibilidade até a própria precisão dos resultados.

É preciso reconhecer que o verdadeiro papel da angiogênese em tumores de ovário só será estabelecido mediante estudos meticolosos e bem planejados que confrontem valores de quantificação vascular com critérios diagnósticos e indicadores robustos de prognóstico ou de resposta terapêutica. Todavia, antes que tais estudos sejam realizados, é de fundamental importância detectar e caracterizar, de forma detalhada, possíveis limitações da metodologia de quantificação de angiogênese. Antes de associarmos diferenças de neovascularização a diferenças biológicas ou clínicas, é imprescindível determinar até que ponto essas variações de angiogênese não poderiam ser devidas simplesmente à falta de precisão e reprodutibilidade das técnicas de quantificação de vasos. Por outro lado, também se deve questionar até que ponto vale a pena o cultivo dos preciosismos metodológicos; muitas vezes o apego a práticas ortodoxas e extremamente trabalhosas (e.g., análise de número exagerado de imagens por caso, proibição do uso de imagens capturadas em formatos de alta compressão [JPEG], etc.) pode não apenas ter pouco impacto na qualidade do trabalho, como dificultar a adaptação da técnica em questão às condições de rotina clínica ou laboratorial.

Em síntese, o presente trabalho vem de encontro às considerações feitas acima, ao propor a **(1)** investigação de possíveis fontes metodológicas de erro na análise quantitativa de angiogênese e **(2)** a quantificação de seu impacto, sempre que possível. Pode-se supor que, com as informações geradas por este estudo, será possível a proposição de um novo corpo de práticas e normas de qualidade em angiogênese quantitativa, seja qual for o seu contexto de aplicação - rotina diagnóstica, pesquisa farmacológica, etc.

3- OBJETIVOS

3.1- Gerais

- Avaliar quantitativamente a influência de variáveis metodológicas na quantificação histológica de estruturas vasculares, em tumores epiteliais do ovário;
- Caracterizar o grau de correlação entre variantes metodológicas, descrevendo, quando cabível, funções matemáticas ou fatores de correção que permitam a interconversão de resultados obtidos através dessas variantes metodológicas.

3.2- Específicos

3.2.1- Avaliar quantitativamente a influência da variável **“formato de armazenamento de imagem”** na quantificação de angiogênese:

- determinando a microvascularização de um campo “hotspot” por tumor ovariano, armazenado em cinco formatos diferentes de imagem (TIFF, JPEGs de alta e baixa qualidade obtidos por ocasião da captura do campo e JPEGs de alta e baixa qualidade obtidos por conversão a partir da imagem TIFF);
- avaliando o grau de concordância entre valores de quantificação vascular obtidos de imagens TIFF e valores obtidos a partir dos diferentes tipos de imagem JPEG (através da determinação do índice de correlação intraclasses - ICC);
- ...e, na presença de concordância inferior a níveis “quase perfeitos” ($ICC < 0,75$), realizando regressão linear simples para pesquisa e eliminação de “outliers”, bem como para a obtenção de função matemática que permita a conversão entre os formatos (quando a eliminação de outliers não elevar a concordância para níveis quase perfeitos).

3.2.2- Avaliar quantitativamente o impacto da variável “**número total de campos analisados**” na quantificação de angiogênese:

- determinando, para cada exemplar tumoral, a microvascularização média em conjuntos de 1, 3, 5, 10, 15 e 20 campos hotspots de médio aumento;
- caracterizando a variabilidade, ou seja, a existência de diferenças significantes entre estes conjuntos de campos quanto aos valores médios de quantificação vascular (i.e., a existência ou não de heterogeneidade entre “hotspots” de um mesmo corte histológico imunocorado);
- ...e, na presença de diferenças significantes, verificando a existência de um “platô de estabilização”, onde os valores médios de quantificação vascular não se alterariam com o aumento no número de campos analisados. Se ocorrer (neste universo de amostragem), o platô de estabilização deverá começar a partir de um conjunto mínimo de campos capaz de representar de forma fidedigna o conjunto total (população) de “hotspots” do corte histológico considerado (já que, quanto maior a amostra [neste caso, o conjunto de campos], maior a proximidade entre seus valores modais [média, mediana, etc] e os valores modais da população de origem [neste caso, o conjunto total dos campos “hotspots” do corte histológico]). Em síntese, esse conjunto mínimo de campos a partir do qual o platô se inicia corresponderá a amostragem mínima de campos necessária à realização de uma análise quantitativa de angiogênese fidedigna.

4- MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo longitudinal, retrospectivo¹.

4.1- Pacientes e espécimes anatomopatológicos

Foram levantados todos os casos de neoplasia epitelial ovariana diagnosticados no CAISM-Unicamp, no período de Janeiro de 1997 a dezembro de 2003. Do ponto de vista clínico, foram definidos como critérios de inclusão: **(1)** ausência de ocorrência de quimio ou radioterapia neoadjuvante, **(2)** de gravidez ao diagnóstico e **(3)** de outras malignidades (sincrônicas ou não). Do ponto de vista anatomopatológico, foram observadas as seguintes condições: **(1)** disponibilidade de blocos de tecidos fixados em formalina, incluídos em parafina e em bom estado de preservação, bem como (a posteriori) **(2)** a obtenção de preparados imunoistoquímicos tecnicamente satisfatórios para a análise morfométrica. Todas as lâminas histológicas disponíveis em cada caso foram revisadas para re-classificação diagnóstica, segundo os critérios mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003). Para seleção do melhor bloco em cada caso, foram levados em conta a representatividade de tecido tumoral e o grau de preservação tecidual.

4.2- Técnica imunoistoquímica

Novos cortes histológicos de 4 µm realizados a partir dos blocos de parafina selecionados foram colocados em lâminas previamente lavadas, desengorduradas e tratadas em solução de organossilano a 25% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América; cod. A3648). As secções foram desparafinizadas em banhos de xilol, hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena

¹Parte desta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com aluna Adriana Yoshida Olímpio, por ocasião de sua dissertação de mestrado⁵⁸.

foi bloqueada por meio de três banhos de H₂O₂ a 10 volumes cada um, com duração de cinco minutos, seguidos de lavagens em PBS. Para recuperação antigênica, foi utilizado calor úmido através de uma panela a vapor T-fall. No interior dessa, as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio, em pH 6,0 durante 30 minutos a 95° C e, a seguir, lavadas em água corrente. Foi pesquisado o marcador vascular CD34, através do anticorpo primário específico anti-CD34 (clone QBEnd/10, DAKO, Carpenteria, Califórnia, Estados Unidos da América; na diluição de 1:50). Este anticorpo foi gotejado sobre o corte histológico na diluição adequada e incubado durante a noite (“overnight”), a temperatura de 4°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, sob agitação, secadas e incubadas com o sistema de revelação baseado em polímero EnVision Plus[®] (DAKO) por 30 minutos a 37° C. Terminada a incubação, foram realizadas três lavagens em PBS, sob agitação. Para a revelação da reação foi utilizado um substrato cromogênico - a solução DAB (tetraidroclorato de 3-3'-diaminobenzidina, Sigma) na proporção de 0,06g para 100mL de PBS-, 500µl de H₂O₂ a 20 volumes e 1mL de DMSO (Sigma), por cinco minutos a 37°C. O material foi, então, lavado em água corrente e contracorado com hematoxilina de Mayer durante 30 a 60 segundos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas em lamínulas e resina Entellan[®] (Merck, Darmstadt, Alemanha). Secções seriadas de cada tumor, não incubadas com o anticorpo primário, foram utilizadas como controles negativos. Além disso, secções histológicas de carcinoma mamário contendo vasos sabidamente positivos para os marcadores vasculares acima mencionados foram utilizados como controles positivos a cada bateria de coloração.

4.3- Seleção de campos, captura e armazenamento de dados

4.3.1- Equipamento

Os preparados imunoistoquímicos foram avaliados utilizando um microscópio Nikon Eclipse E200 de campo claro, acoplado a uma câmera digital CCD Nikon coolpix 995 (3.34Mpixels). Todas as capturas de imagem foram realizadas com objetiva de 10X.

4.3.2- Seleção e captura de campos para os estudos comparativos entre formatos de imagem (N=81 tumores mucinosos)

Inicialmente, todo o corte histológico foi avaliado por varredura, utilizando a objetiva de 5X (panorâmica), com o intuito de identificar 1 área intratumoral de maior densidade vascular (“hotspot”). Imagens desta área foram então capturadas em objetiva de 10X e armazenadas em formato TIFF, JPEG de alta qualidade (“fine”) e JPEG de baixa qualidade (“basic”). Posteriormente, imagens do tipo JPEG de alta e baixa qualidade (JPEG “high” e “low”, respectivamente) foram obtidas a partir da conversão, em Adobe Photoshop® (versão CS2), de imagens originalmente capturadas no formato TIFF (Figura 1). Todas as imagens foram, então, devidamente catalogadas e transferidas para mídia de estocagem permanente (DVD), com o objetivo de realizar *backup* e facilitar o transporte dos dados brutos para outras estações de trabalho.

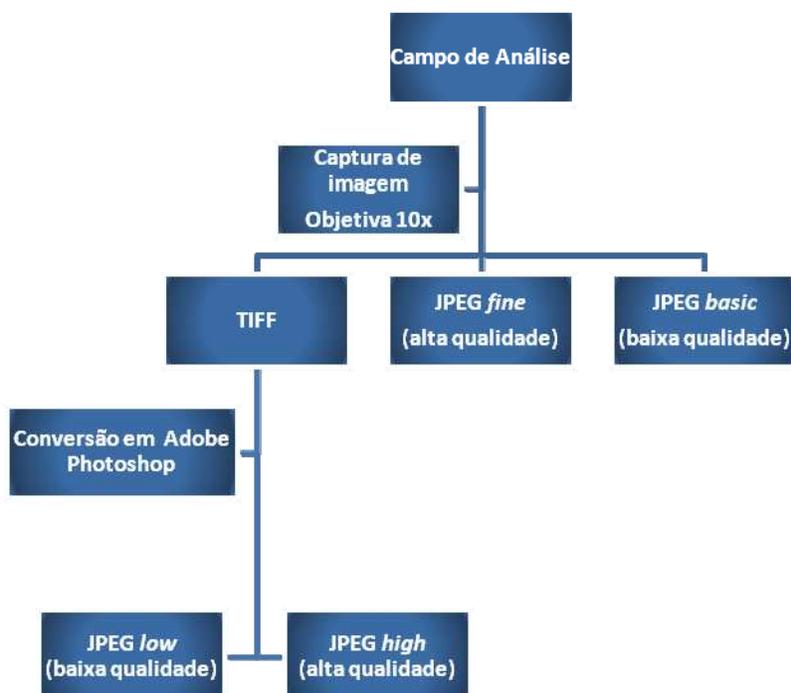


Figura 1- Fluxograma de obtenção dos diferentes formatos de imagem

4.3.3- Seleção e captura de campos para os estudos comparativos entre conjuntos de campos avaliados por caso (N= 24 casos selecionados aleatoriamente, por sorteio - 12 neoplasias serosas e 12 neoplasias mucinosas [sendo 4 benignas, 4 “borderline” e 4 malignas, para cada tipo histológico])

Para efeito de comparação entre totais de campos analisados, foram utilizadas apenas imagens TIFF. Nesta situação de comparação, foram capturadas 20 imagens consideradas como “hotspots”, a medida que se apresentavam ao observador (i.e., “hotspots” aleatórios). Os conjuntos de análise (=1, 3, 5 10, 15 e 20 imagens) foram criados, seguindo a ordem de captura

(primeira imagem; três primeiras imagens; cinco primeiras imagens e assim sucessivamente). Os resultados referentes aos parâmetros de quantificação vascular foram expressos como média de cada conjunto de imagem. Finalmente, estes resultados foram reunidos (“plotados”) em uma curva ou gráfico de estabilização (valor médio/mediano da variável quantitativa vs. número total de imagens analisadas), para comparação entre os subgrupos e estabelecimento do N mínimo de imagens/por caso.

4.4- Análise quantitativa da angiogênese (parâmetros de quantificação vascular)

As imagens representativas de áreas intratumorais contendo estruturas vasculares (“hotspots”), foram avaliadas no programa de análise de imagens Imagelab (versão 2.4), que permite a contagem manual e automática de microestruturas vasculares² (i.e., MVD manual e automático), bem como a determinação automática das áreas endoteliais total (AEndT), percentual em relação ao campo de análise (AEnd%) e média (AEndM - área média por estrutura vascular). Nos cálculos dos parâmetros ditos “automáticos” a segmentação das estruturas imunocoradas para CD34 ocorreu de forma semiautomática, isto é, com a participação do observador. Resumidamente, a atuação do operador do programa de análise de imagem (JNS ou AAS) na etapa de segmentação de imagem consistiu em selecionar as áreas de interesse (endotélio positivo para CD34), utilizando histogramas de intensidade do pixel criados pelo programa para cada uma das três cores do sistema RGB (red-green-blue), conforme ilustrado na Figura 2.

²Neste estudo, estruturas microvasculares são definidas em consonância com a maioria dos trabalhos na literatura, ou seja, como estruturas positivas para o marcador vascular, destituídas de camada muscular média, que podem apresentar ou não lúmen (este com diâmetro inferior a 350µm).

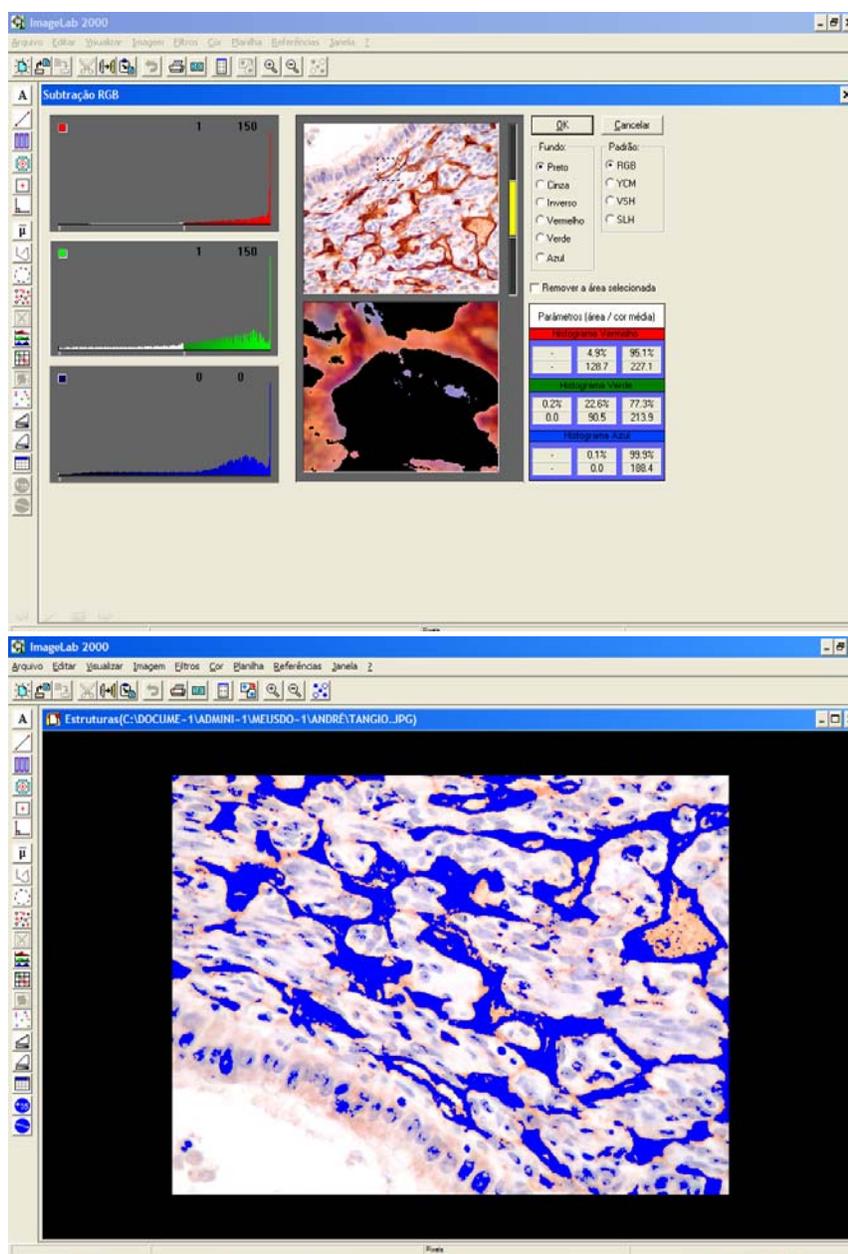


Figura 2- Imagens ilustrativas do procedimento de segmentação semiautomática de estruturas vasculares no programa de análise de imagem Imagelab (v. 2.4). Na figura superior, nota-se o processo de seleção das áreas imunocoradas propriamente dito, enquanto, na inferior, observa-se o resultado final da segmentação (as regiões imunocoradas segmentadas estão destacadas em azul e prontas para serem quantificadas pelo programa).

4.5- Análise estatística

A concordância entre valores de quantificação vascular obtidos de imagens TIFF e JPEG foi avaliada através do cálculo do índice de correlação intraclasses (ICC). Na ausência de correlação “quase perfeita” ($ICC < 0,75$; segundo os critérios de Landis & Kock [1977]), procedemos à regressão linear simples para pesquisa e eliminação de outliers, bem como para o estabelecimento de modelos de predição que permitissem a interconversão de valores obtidos a partir de imagens de formatos diferentes. Na análise da variabilidade de resultados obtidos a partir de diferentes conjuntos de amostragem de campos, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. Nesta análise de variabilidade, também procedemos ao cálculo do coeficiente de variação. Em ambas as análises, um valor de P inferior a 0.05 foi considerado como estatisticamente significativo. Os testes estatísticos foram realizados utilizando os programas: SPSS para “Windows” (versão 10.0) e Statistical Analysis System for Windows, versão 9.2 (2008).

4.6- Reprodutibilidade interobservador (fidedignidade da análise)

Dez por cento do total de imagens capturadas, aleatoriamente selecionado, foi submetido à avaliação paralela por um segundo observador (AAS). A concordância interobservador (JNS x AAS), avaliada através do ICC, foi superior a 0.90 para todos os parâmetros de quantificação vascular analisados.

5- ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas com registro de número 406/2004.

6- RESULTADOS

6.1- Primeira parte - Influência do formato de imagem sobre valores de quantificação microvascular

Nesta etapa, verificou-se a concordância entre imagens TIFF (padrão ouro) e JPEG, estabelecendo, se necessário, modelos de conversão entre ambos os formatos de imagens. Utilizou-se, para tanto, o coeficiente de correlação intraclass (ICC). Na interpretação dos resultados de concordância, consideraram-se os critérios de Landis & Kock (1977), explicitados a seguir:

- a)** Concordância quase perfeita: ICC= 0,75-1,00;
- b)** Concordância substancial: ICC= 0,60-0,75;
- c)** Concordância moderada: ICC= 0,40-0,60;
- d)** Concordância regular: ICC= 0,20-0,40;
- e)** Concordância discreta: ICC= 0-0,20;
- f)** Concordância pobre: ICC= -1,00-0.

A Figura 3 ilustra os diferentes formatos de imagem, enquanto a Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para testes de correlação entre imagens TIFF x JPEG.

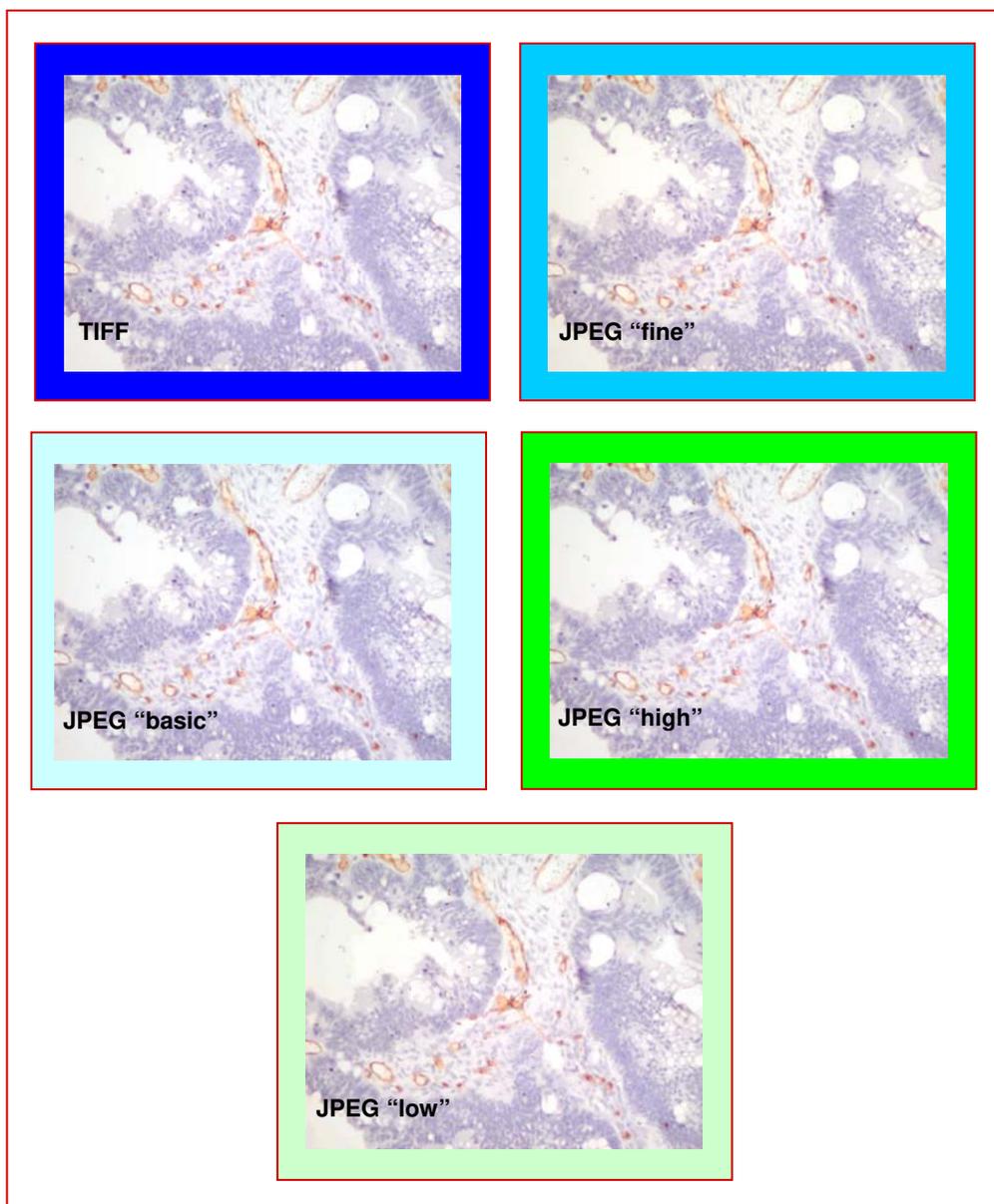


Figura 3- Fotomicrografias representativas da imunoposição do marcador CD34 nos diferentes formatos de imagem utilizados no trabalho. Imunoperoxidase, 100X (aumento original)

Tabela 1- Coeficiente de correlação intraclassas (ICC) em medida única para imagens TIFF x JPEG

	JPEGhigh	JPEGLow	JPEGbasic	JPEGfine
MVDm	0,999	0,999	0,999	0,999
MVDa	0,949	0,606*	0,733*	0,881
TIFF				
AENDm	0,687*	0,648*	0,912	0,789
AEND%	0,951	0,953	0,913	0,902
AENDt	0,304*	0,292*	0,152*	0,968

TIFF: formato de imagem padrão ouro (isto é sem compressão/perda de informação). **JPEGhigh e low:** imagens de alta qualidade (baixa compressão) e baixa qualidade (alta compressão), respectivamente, obtidas a partir da conversão da imagem TIFF, em programa de edição de imagens (Adobe Photoshop®). **JPEGfine e basic:** imagens de alta qualidade (baixa compressão) e baixa qualidade (alta compressão), respectivamente, obtidas no momento da captura (trata-se de opções válidas de formato de estocagem disponíveis na câmera do sistema de captura). **MVD:** densidade de microvasos obtida manual (**MVDm**) ou automaticamente (**MVDa**). **AEndm:** área endotelial média (área coberta pelo endotélio CD34+ de uma estrutura vascular em média ou área endotelial total do campo dividida pelo número de microvasos). **AEnd%:** área endotelial percentual (percentagem do campo coberta por endotélio vascular CD34+). **AEndt:** área endotelial total (somatório de todas as áreas discretas cobertas por endotélio vascular CD34+).

A partir de uma análise qualitativa/subjetiva, ambos os observadores do estudo (JNS e AAS) concordam na ausência de diferenças significantes entre as fotomicrografias dos diferentes formatos de imagem, pelo menos à simples inspeção visual (o que pode ser confirmado em uma análise rápida da Figura 3). Contudo, esta observação subjetiva não corresponde exatamente aos resultados obtidos a partir da análise histométrica (objetiva) das imagens. De fato, observa-se, a partir da Tabela 1, uma concordância quase perfeita ($ICC > 0,75$) entre TIFF e os diferentes tipos de JPEG em quase todas as variáveis de quantificação vascular consideradas. Entretanto, exceções ocorrem quando se comparam: TIFF e JPEGhigh (em AEndm e AEndt); TIFF e JPEGlow (em MVDA, AEndm e AEndt); e TIFF e JPEGbasic (em MVDA e AEndt). É possível observar, igualmente, que os valores máximos de ICC ocorrem nas análises de MVDm e AEnd% (independentemente do tipo de JPEG considerado) e nas comparações entre TIFF e JPEGfine (independentemente da variável de quantificação avaliada).

Para valores de ICC considerados substanciais, moderados, regulares ou discretos (*), aplicou-se a análise de regressão linear simples, a fim de identificar modelos de predição da imagem TIFF a partir de imagens JPEG. Essa análise também serviu para identificar “outliers” (desvios numéricos expressivos, possivelmente decorrentes de erro de mensuração), cuja eliminação poderia eventualmente aumentar a concordância entre as imagens. Os resultados dessa análise são apresentados nos gráficos das Figuras 4 a 12 e Tabelas 2 a 8.

6.1.1- Apresentação dos modelos de predição desenvolvidos nos casos de ICC<0,75 através de regressão linear simples

i) TIFF x JPEGlow para MVD automático (ICC= 0,606)

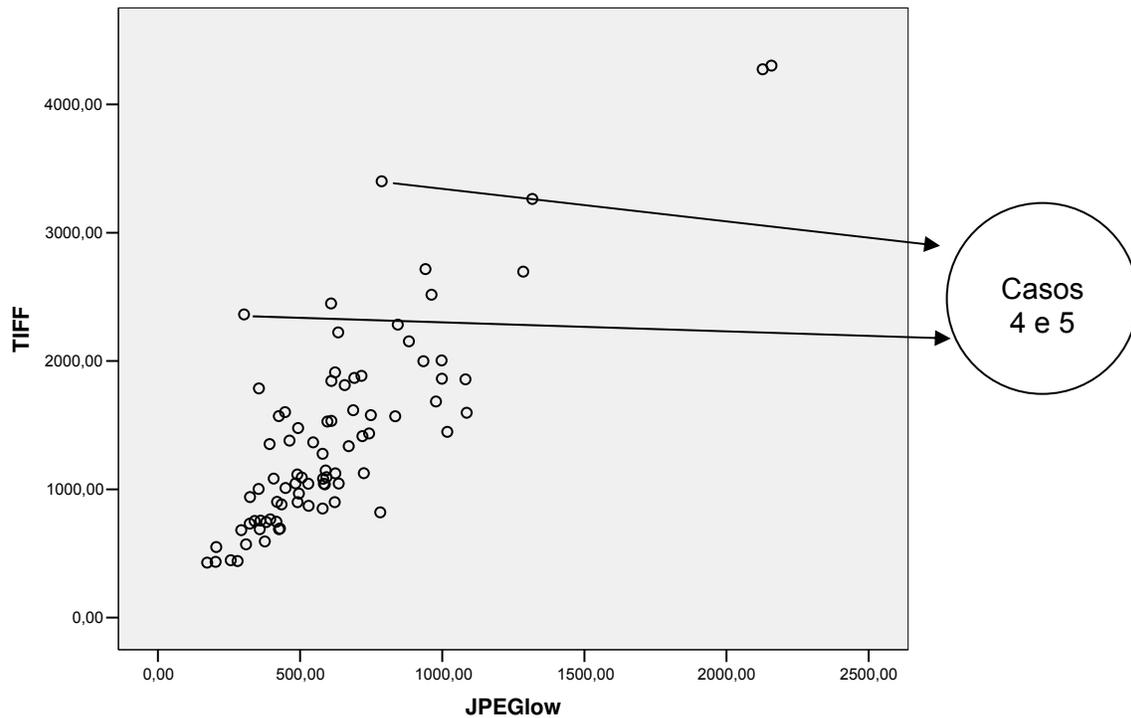


Figura 4- Dispersão das medidas de MVD automático entre os tipos de imagem TIFF e JPEGlow (ICC=0,606). Note que os casos 4 e 5 se comportam como “outliers” (i.e., desvios numéricos expressivos, possivelmente decorrentes de erro de mensuração)

Após a análise da dispersão das medidas entre JPEGlow e TIFF para MVD automático, obteve-se o modelo de conversão entre tais imagens para a variável em questão, a partir da regressão linear, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2- Resultados da regressão linear para obtenção do modelo de conversão de JPEGlow para TIFF na variável MVDa

TIFF= a + b*JPEGlow			
Variável	Parâmetro	Erro padrão	p-valor
Intercepto	230.44466 (a)	103.56529	0.0289
JPEGlow	1.89413 (b)	0.14471	<.0001

R² do modelo = 0.6844

O modelo de conversão acima atinge cerca de 68% de ajuste na medida (R² = coeficiente de determinação= 0.6844), e pela análise do diagnóstico do ajuste, verificou-se possíveis “outliers” (casos padronizados maiores que 3), como mostrados na Tabela 3 e Figura 5.

Tabela 3- Casos “outliers”

No. do Caso	Residual padrão	TIFF	Valor esperado	Residual
4	3,493	2363,00	804,3675	1558,63254
5	3,762	3400,00	1721,1286	1678,87138

A variável dependente: TIFF

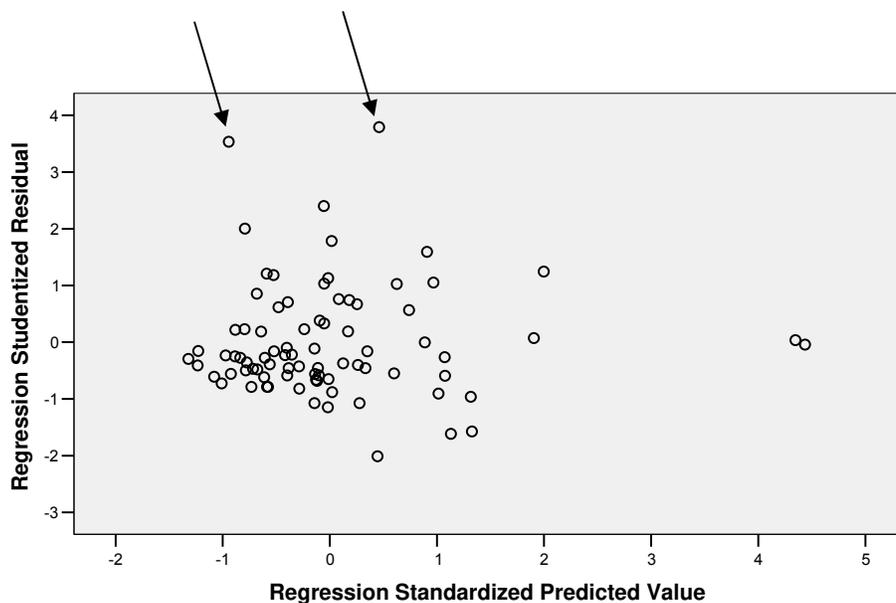


Figura 5- Gráfico de resíduos(TIFFxJPEGLow - MVDAutomático). Setas: “outliers”

As setas na Figura 5 apontam os possíveis “outliers”, os quais foram, então, excluídos. Dessa forma, aplicando-se novo ICC, e em seguida, nova análise de regressão linear, comprovou-se uma melhora no modelo de predição, cujo coeficiente de determinação passou a ser 0,7698, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4- Resultados da regressão linear para obtenção do modelo de conversão de JPEGLow para TIFF na variável MVDA, após eliminação dos outliers

TIFF= a + b*JPEGLow			
Variável	Parâmetro	Erro padrão	p-valor
Intercepto	172.82314 (a)	85.98854	0.0480
JPEGLow	1.92053 (b)	0.11969	<.0001

R² do modelo = 0.7698

Com base nos dados da Tabela 4, podemos dizer que, com a eliminação dos outliers o melhor modelo de conversão de valores entre tipos de imagem passa a ser: **TIFF= 172,8 + 1,92. JPEGlow.**

ii) TIFF x JPEGbasic para MVD automático (ICC= 0,733)

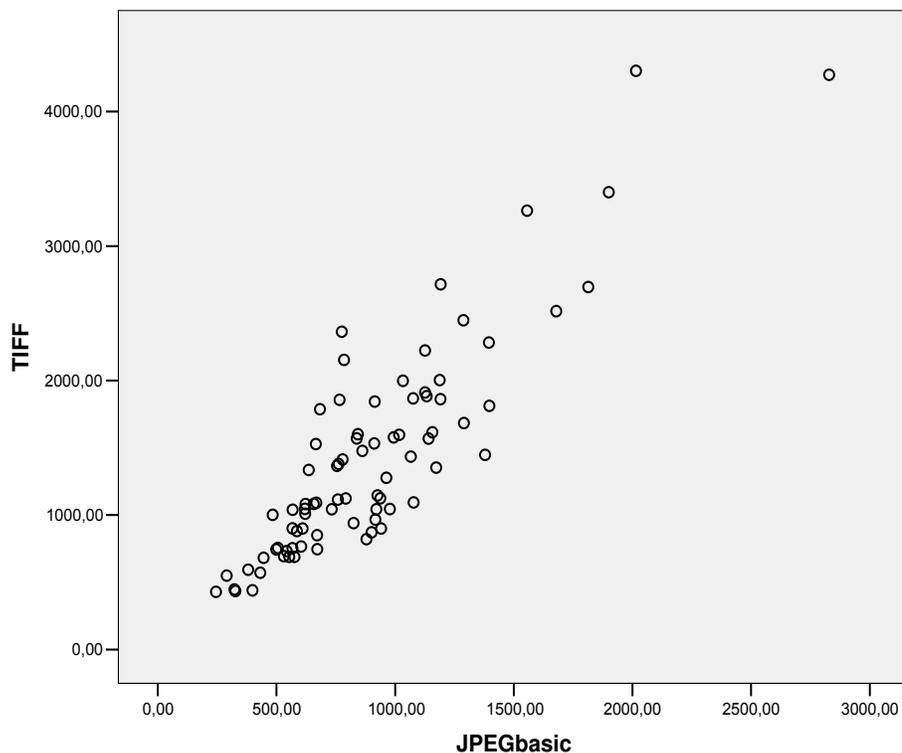


Figura 6- Dispersão das medidas de MVD automático entre os tipos de imagem TIFF e JPEGbasic (ICC= 0,733)

Após a análise da dispersão das medidas entre JPEG basic e TIFF para MVD automático, obteve-se o modelo de conversão entre tais imagens para a variável em questão, a partir da regressão linear, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5- Resultados da regressão linear para obtenção do modelo de conversão de JPEGbasic para TIFF na variável MVDa

TIFF= a + b*JPEGbasic			
Variável	Parâmetro	Erro padrão	p-valor
Intercepto	-38.56956 (a)	98.46451	0.6963
JPEGbasic	1.63585 (b)	0.09980	<.0001

R² do modelo = 0.7728

O modelo de conversão entre imagens TIFF x JPEGbasic, para a variável MVD automático atinge cerca de 77% de ajuste na medida (R²=coeficiente de determinação=0.7728). Observando-se o gráfico de resíduos neste caso (Figura 7), nota-se a ausência de novos “outliers”, não sendo, portanto, necessário um novo ajuste do modelo. Neste caso, a função ideal para interconversão de valores seria: **TIFF= -38,57 + 1,6. JPEGbasic.**

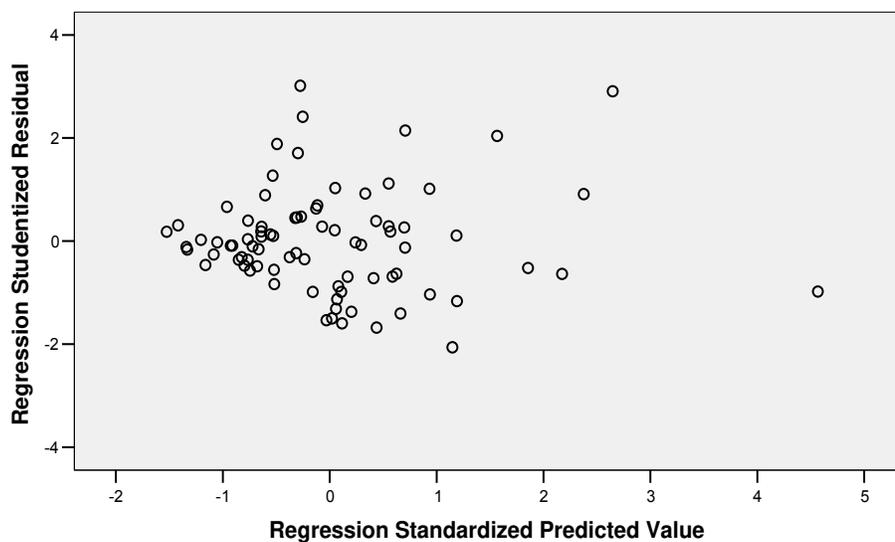


Figura 7- Gráfico de resíduos (TIFFxJPEGbasic - MVDAutomático)

iii) TIFF x JPEGhigh para AEnd média (ICC= 0,687)

Tabela 6- Resultados da regressão linear para obtenção do modelo de conversão de JPEGhigh para TIFF na variável AEndm

TIFF= a + b*JPEGhigh			
Variável	Parâmetro	Erro padrão	p-valor
Intercepto	116.97436 (a)	122.17676	0.3413
JPEGhigh	1.60195 (b)	0.11775	<.0001

R² do modelo = 0.7009

O diagnóstico do ajuste do modelo, conforme apresentado na Tabela 7, mostra a presença de um “outlier” (caso 31).

Tabela 7- Caso “outlier”

No. do Caso	Residual padrão	TIFF	Valor esperado	Residual
31	8,832	9769,89	128,4235	9641,47050

Após a exclusão do possível “outlier” (caso 31), a análise de correlação intraclasse (ICC) entre TIFF x JPEG high para a medidas de AEND média passou a ser de 0.895, IC95% (0.841,0.931), isto é, a concordância passa a ser quase perfeita, não havendo necessidade de se obter um modelo de interconversão. Os dados da dispersão entre essas medidas estão apresentados na Figura 8.

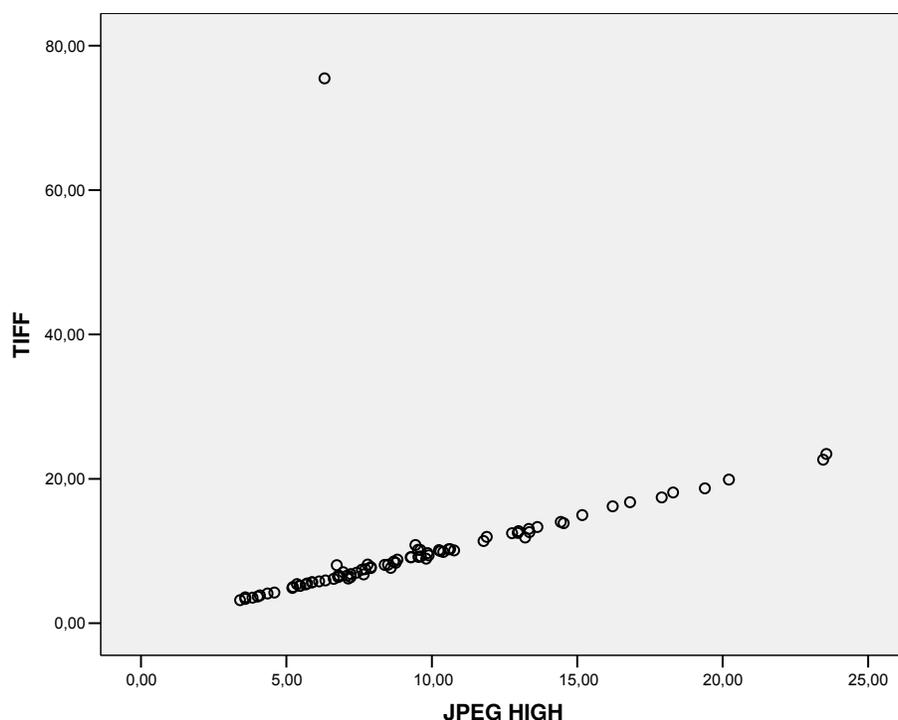


Figura 8- Dispersão das medidas AEnd média entre os tipos de imagem (TIFFxJPEGhigh)

iv) TIFF x JPEGlow para AEnd média (ICC= 0,648)

Tabela 8- Resultados da regressão linear para obtenção do modelo de conversão de JPEGlow para TIFF na variável AEndm

TIFF= a + b*JPEGlow			
Variável	Parâmetro	Erro padrão	p-valor
Intercepto	97.89947 (a)	122.50630	0.4266
JPEGlow	1.76284 (b)	0.12980	<.0001

R² do modelo = 0.7001

Excluindo-se os “outliers” (casos 4, 13 e 31), a análise de correlação intraclasse (ICC) entre TIFF x JPEG low para a medidas de AENDmédia foi de 0.994, IC95% (0.981,0.997). Novamente, a concordância passa a ser quase perfeita, não havendo necessidade de se obter um modelo de interconversão. Os dados da dispersão entre essas medidas estão apresentados na Figura 9.

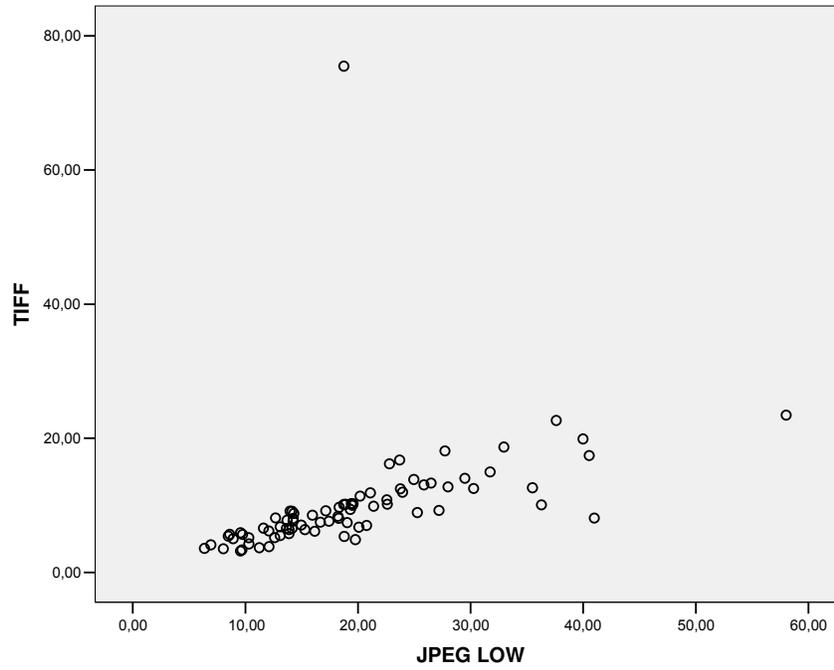


Figura 9- Dispersão das medidas AENDmédia entre os tipos de imagem (TIFFxJPEGlow)

v) Análises da relação entre imagens JPEG e TIFF para a medida AEnd total, após a exclusão de casos “outliers” (Figuras 10, 11 e 12)

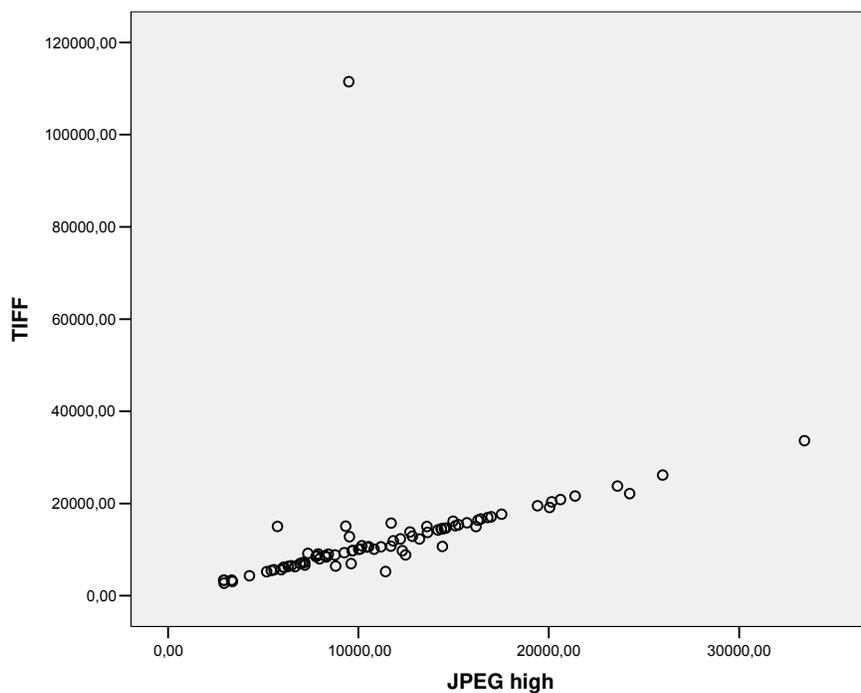


Figura 10- Dispersão das medidas de AEND total entre os tipos de imagem (TIFFxJPEGhigh) com ICC excluindo o caso 13 = 0.953 IC95% (0.927, 0.969)

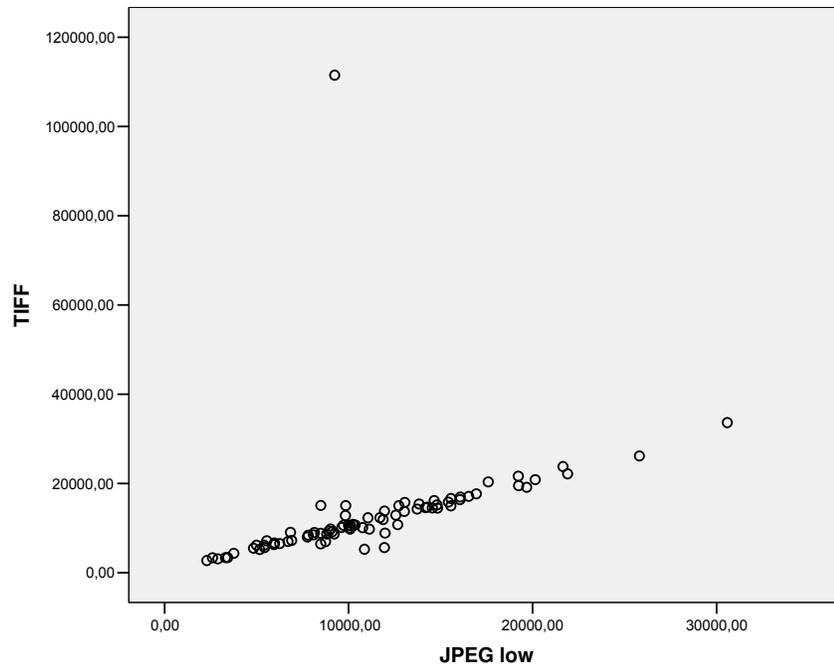


Figura 11- Dispersão das medidas de AEND total entre os tipos de imagem (TIFFxJPEGlow) com ICC excluindo o caso 13 = 0.951 IC95% (0.922, 0.969)

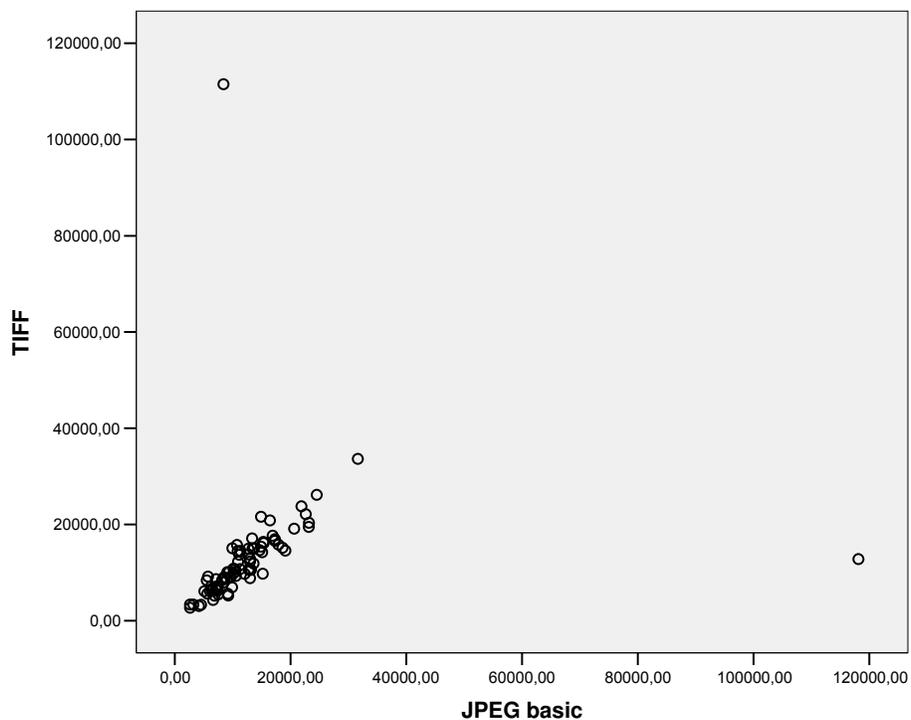


Figura 12- Dispersão das medidas de AEND total entre os tipos de imagem (TIFFxJPEGbasic) com ICC excluindo os casos 13 e 28= 0.921 IC95% (0.879, 0.949)

Constata-se, a partir de uma análise dos gráficos acima (Figuras 10, 11 e 12) que, após a exclusão dos elementos “outliers”, a concordância em todos os casos passa a ser quase perfeita, não havendo necessidade de se obter uma função de interconversão.

6.1.2- Síntese das análises de regressão linear em casos onde, inicialmente, o ICC era menor que 0,75

Em resumo, considerando-se todas as análises de regressão realizadas nesta primeira parte dos resultados, pode-se dizer que, com a identificação e eliminação de elementos “outliers”, a concordância entre imagens TIFF e os vários tipos de JPEG aumenta muito a ponto de se tornar quase perfeita (ICC.> 0,75). Assim sendo, torna-se dispensável a necessidade de se recorrer a funções de conversão ou fórmulas de correção quando se deseja comparar valores quantitativos de angiogênese obtidos a partir de imagens de formatos diferentes. As únicas exceções (i.e., situações em que o ICC permanece inferior a 0,75, mesmo com a exclusão de “outliers”) ocorrem na variável de análise MVD automática, quando confrontamos TIFF e JPEGs de baixa qualidade ou alta compressão (JPEG low e basic). Nesses casos, aplicação de modelos de conversão de valores consegue atingir ajustes de até 76 e 77%, na correção de valores obtidos a partir de imagens JPEG low e basic, respectivamente.

6.2- Segunda parte - Influência do número total de campos de análise sobre valores de quantificação microvascular

Com o objetivo de se determinar o número mínimo de campos necessário a uma análise fidedigna de angiogênese em uma amostra histológica (uma lâmina), avaliamos a variabilidade das quantificações de vasos em relação ao número total de campos estudados. Para tanto, procedemos a uma análise descritiva com apresentação de medidas de posição e dispersão para variáveis numéricas. Para avaliação de possíveis diferenças entre conjuntos de campos, foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas. A mediana em cada conjunto de campos (para cada parâmetro de análise) foi utilizada como medida resumo (normalização de resultados) de cada amostra. A variabilidade também foi estudada através do coeficiente de variação. O coeficiente de variação é uma medida de dispersão em torno da média. Diz-se que a distribuição possui pequena

variabilidade quando o coeficiente é $\leq 10\%$ (15% para alguns autores), média dispersão quando $10\% < CV < 20\%$ e alta dispersão quando $\geq 20\%$ (ou 30%). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5%.

A variabilidade entre conjuntos de campos para a variável AEnd média é apresentada em termos descritivos e analíticos na Tabela 9 e na Figura 13.

Tabela 9- Análise descritiva e comparação da medida área endotelial média (AEnd média) entre grupos de neoplasias e numero de campos N=24)

Grupo	Variável	N	Media	DP	Minimo	Mediana	Maximo
Mucinoso	Mediana 1	12	4.34	2.24	2.28	3.59	8.47
	Mediana 3	12	4.47	1.72	2.21	4.07	8.03
	Mediana 5	12	4.56	1.75	2.21	3.88	7.36
	Mediana 10	12	4.21	1.36	2.31	3.92	7.03
	Mediana 15	12	4.25	1.28	2.41	4.08	6.89
	Mediana 20	12	4.10	1.07	2.46	3.94	6.30
Seroso	Mediana 1	12	5.92	3.33	2.53	4.87	12.97
	Mediana 3	12	4.85	1.72	2.63	4.40	8.69
	Mediana 5	12	5.09	2.04	2.97	4.40	9.73
	Mediana 10	12	5.26	1.96	3.20	4.56	9.29
	Mediana 15	12	5.32	2.12	3.03	4.51	10.05
	Mediana 20	12	5.40	2.20	3.35	4.40	10.57

Resultados da ANOVA para medidas repetidas:

Efeito	pvalor
Grupo	0.1900
Campo	0.4619
Grupo*Campo	0.2576

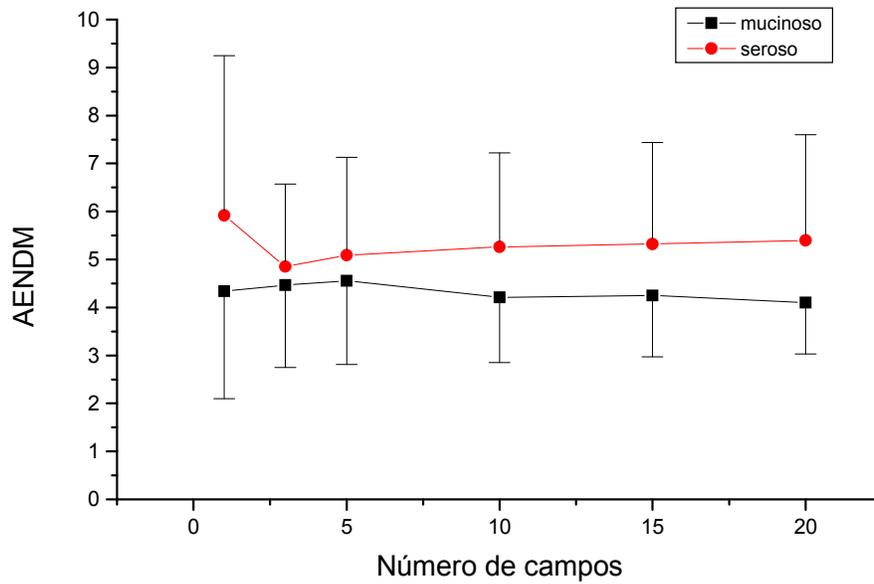


Figura 13- Valores médios e desvios padrão para cada conjunto de campos e grupo (tipo histológico de neoplasia), para a variável AEnd media

Do ponto de vista estatístico, não foram evidenciadas diferenças significantes entre conjuntos de campos ou grupos de neoplasias, para a variável AEnd média.

A variabilidade entre conjuntos de campos para a variável AEnd total é apresentada em termos descritivos e analíticos na Tabela 10 e na Figura 14.

Tabela 10- Análise descritiva e comparação da medida área endotelial total (AEndt) entre grupos de neoplasias e numero de campos (N=24)

Grupo	Variável	N	Media	DP	Minimo	Mediana	Maximo
Mucinoso	Mediana 1	12	10452.39	4131.29	4574.34	10575.21	17711.17
	Mediana 3	12	9534.66	2750.00	5472.25	10160.57	13320.36
	Mediana 5	12	9937.71	2210.01	6000.70	10151.19	12983.83
	Mediana 10	12	9709.90	2007.20	6422.27	9781.05	12584.16
	Mediana 15	12	9765.39	2360.43	7276.87	9340.16	14616.75
	Mediana 20	12	9421.18	1971.27	6560.89	9408.72	12358.50
Seroso	Mediana 1	12	9532.70	4664.31	1559.23	9568.61	17959.08
	Mediana 3	12	11015.92	3261.40	6385.85	10458.72	17292.67
	Mediana 5	12	10978.11	3199.97	7526.00	10650.26	17509.32
	Mediana 10	12	11389.00	3044.85	7998.69	10626.13	19150.08
	Mediana 15	12	11225.34	2989.40	7150.33	10680.65	17509.32
	Mediana 20	12	10947.17	3003.01	7466.47	10577.38	17428.59

Resultados da ANOVA para medidas repetidas:

Efeito	pvalor
Grupo	0.3325
Campo	0.7555
Grupo*Campo	0.1733

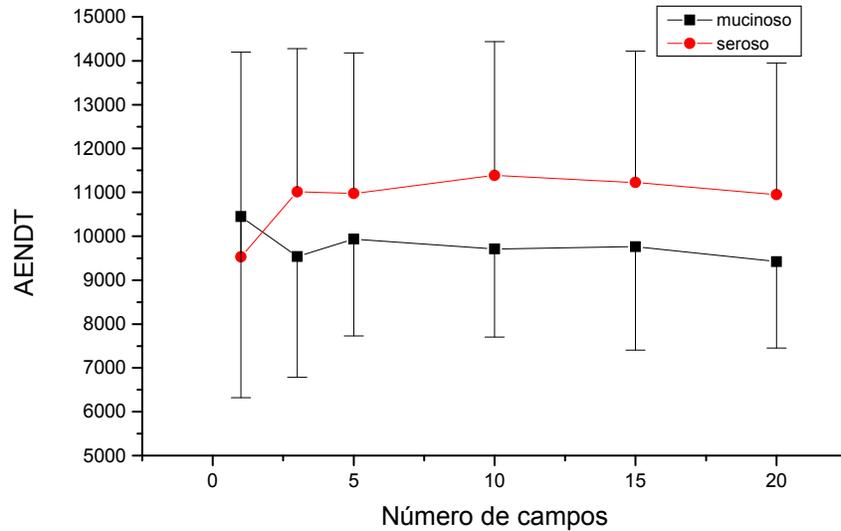


Figura 14- Valores médios e desvios padrão para cada conjunto de campos e grupo (tipo histológico de neoplasia), para a variável AEnd total

Do ponto de vista estatístico, não foram evidenciadas diferenças significantes entre conjuntos de campos ou grupos de neoplasias, para a variável AEnd total.

A variabilidade entre conjuntos de campos para a variável AEnd% é apresentada em termos descritivos e analíticos na Tabela 11 e na Figura 15.

Tabela 11- Análise descritiva e comparação da medida área endotelial percentual (AEnd%) entre grupos de neoplasias e numero de campos (N=24)

Grupo	Variável	N	Media	DP	Minimo	Mediana	Maximo
Mucinoso	Mediana 1	12	4.10	1.42	1.90	4.35	6.40
	Mediana 3	12	3.94	1.13	2.30	4.20	5.50
	Mediana 5	12	4.05	0.85	2.50	4.20	5.20
	Mediana 10	12	3.93	0.82	2.65	3.88	5.20
	Mediana 15	12	3.91	0.90	3.00	3.80	6.00
	Mediana 20	12	3.81	0.73	2.70	3.90	5.10
Seroso	Mediana 1	12	4.40	1.74	2.20	4.00	7.40
	Mediana 3	12	4.65	1.44	2.60	4.30	7.10
	Mediana 5	12	4.63	1.42	3.10	4.40	7.20
	Mediana 10	12	4.73	1.26	3.30	4.38	7.90
	Mediana 15	12	4.63	1.23	2.90	4.40	7.20
	Mediana 20	12	4.51	1.23	3.10	4.38	7.15

Resultados da ANOVA para medidas repetidas:

Efeito	pvalor
Grupo	0.1524
Campo	0.8836
Grupo*Campo	0.7462

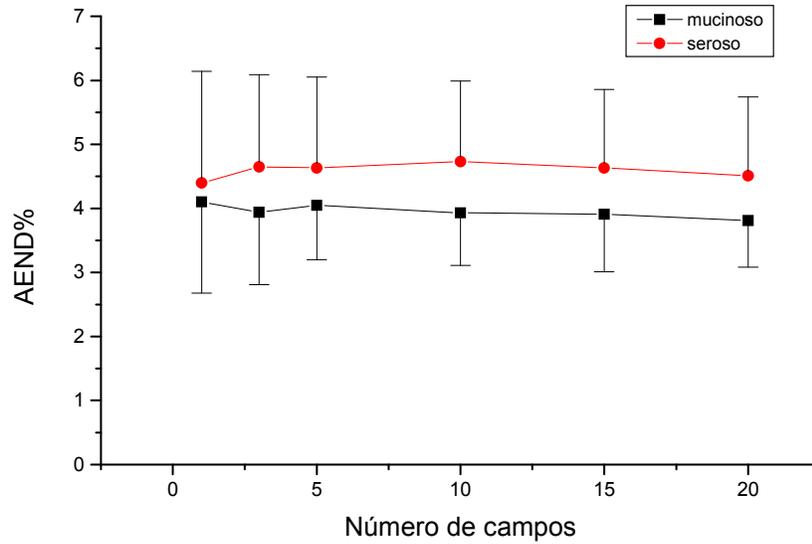


Figura 15- Valores médios e desvios padrão para cada conjunto de campos e grupo (tipo histológico de neoplasia), para a variável AEnd%

Do ponto de vista estatístico, não foram evidenciadas diferenças significantes entre conjuntos de campos ou grupos de neoplasia, para a variável AEnd%.

A variabilidade entre conjuntos de campos para a variável MVD manual é apresentada em termos descritivos e analíticos na Tabela 12 e na Figura 16.

Tabela 12- Análise descritiva e comparação da medida densidade de microvasos manual (MVDm) entre grupos de neoplasias e numero de campos (N=24)

Grupo	Variável	N	Media	DP	Minimo	Mediana	Maximo
Mucinoso	Mediana 1	12	41.50	34.19	8.00	28.00	132.00
	Mediana 3	12	27.58	15.08	9.00	23.00	62.00
	Mediana 5	12	28.42	15.36	13.00	23.00	62.00
	Mediana 10	12	30.33	15.57	13.00	23.50	62.00
	Mediana 15	12	31.08	13.41	10.00	27.00	53.00
	Mediana 20	12	29.46	11.74	10.00	26.00	48.00
Seroso	Mediana 1	12	25.00	43.50	3.00	10.50	156.00
	Mediana 3	12	21.33	29.09	3.00	10.50	103.00
	Mediana 5	12	18.92	22.46	4.00	10.00	76.00
	Mediana 10	12	17.71	17.23	5.00	10.75	54.00
	Mediana 15	12	14.17	12.80	5.00	10.00	52.00
	Mediana 20	12	13.67	10.23	6.00	10.25	41.50

Resultados da ANOVA para medidas repetidas:

Efeito	pvalor
Grupo	0.0756
Campo	0.2073
Grupo*Campo	0.5835

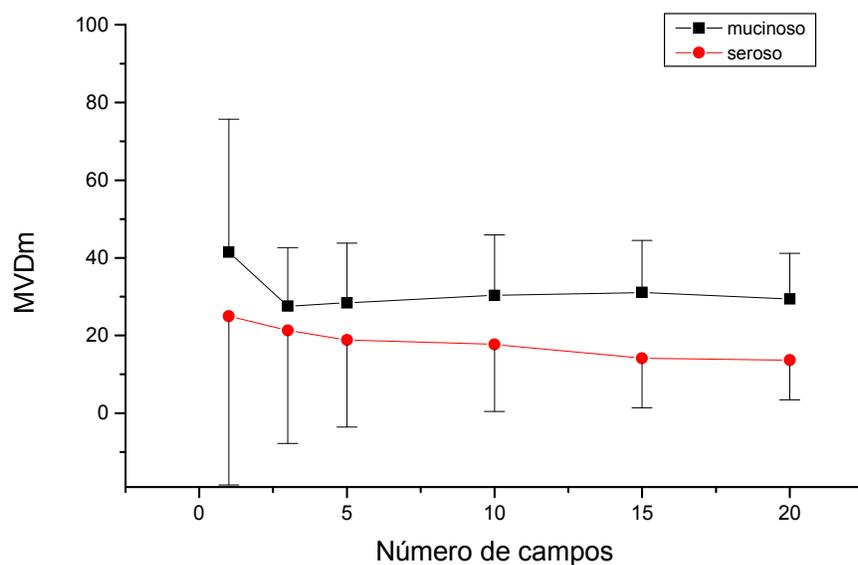


Figura 16- Valores médios e desvios padrão para cada conjunto de campos e grupo (tipo histológico de neoplasia), para a variável MVDm

Do ponto de vista estatístico, não foram evidenciadas diferenças significantes entre conjuntos de campos ou grupos de neoplasia, para a variável MVDm.

A variabilidade entre conjuntos de campos para a variável MVD automática é apresentada em termos descritivos e analíticos na Tabela 13 e na Figura 17.

Tabela 13- Análise descritiva e comparação da medida densidade de microvasos manual (MVDm) entre grupos de neoplasias e numero de campos (N=24)

Grupo	Variável	N	Media	DP	Minimo	Mediana	Maximo
Mucinoso	Mediana 1	12	2848.00	1662.81	675.00	2316.00	5663.00
	Mediana 3	12	2300.00	1042.06	1399.00	1812.00	4781.00
	Mediana 5	12	2435.50	1056.13	1234.00	2100.00	4781.00
	Mediana 10	12	2517.71	957.56	1316.50	2121.75	4050.50
	Mediana 15	12	2423.75	825.53	1449.00	2091.50	3994.00
	Mediana 20	12	2370.38	746.07	1549.00	2143.25	3852.00
Seroso	Mediana 1	12	2061.25	765.33	947.00	2149.00	3083.00
	Mediana 3	12	2529.67	597.04	1663.00	2619.50	3425.00
	Mediana 5	12	2332.58	583.02	1211.00	2399.50	3135.00
	Mediana 10	12	2313.88	672.26	1020.50	2246.00	3311.00
	Mediana 15	12	2327.08	683.51	947.00	2212.00	3380.00
	Mediana 20	12	2276.54	664.32	1041.50	2142.25	3286.50

Resultados da ANOVA para medidas repetidas:

Efeito pvalor

Grupo 0.6039

Campo 0.9254

Grupo*Campo 0.0030

Fixando grupo e verificando o efeito do número de campos:

mucinoso, p-valor=0.1149; seroso, p-valor=**0.0427** diferença entre 1 e 3

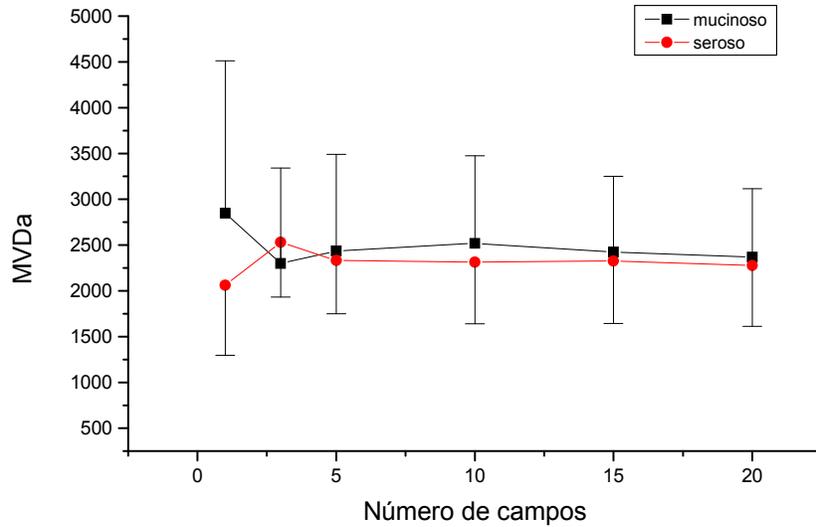


Figura 17- Valores médios e desvios padrão para cada conjunto de campos e grupo (tipo histológico de neoplasia), para a variável MVDa

Do ponto de vista estatístico, não foram evidenciadas diferenças significantes entre conjuntos de campos ou grupos de neoplasia, para a variável MVDa, salvo no grupo de neoplasias serosas, onde se observa uma diferença significativa entre 1 e 3 campos (a partir de 3 campos não há diferença significativa).

Tabela 14- Coeficientes de variação no grupo de tumores mucinosos e número de campos

	Variable	N	Mean	Median
Grupo mucinoso	cv_aendm1	0	.	.
	cv_aendm3	12	21.0	21.9
	cv_aendm5	12	21.9	18.5
	cv_aendm10	12	41.6	30.2
	cv_aendm15	12	39.5	27.1
	cv_aendm20	12	39.9	28.2
	cv_aendt1	0	.	.
	cv_aendt3	12	27.5	31.3
	cv_aendt5	12	30.0	30.4
	cv_aendt10	12	40.7	32.1
	cv_aendt15	12	41.1	33.6
	cv_aendt20	12	41.2	33.5
	cv_aendp1	0	.	.
	cv_aendp3	12	25.5	29.4
	cv_aendp5	12	29.0	30.5
	cv_aendp10	12	31.0	31.9
	cv_aendp15	12	32.0	32.3
	cv_aendp20	12	31.8	32.3
	cv_mvdm1	0	.	.
	cv_mvdm3	12	39.9	29.7
	cv_mvdm5	12	42.1	37.0
	cv_mvdm10	12	45.2	44.9
	cv_mvdm15	12	46.1	46.0
	cv_mvdm20	12	46.3	46.2
	cv_mvda1	0	.	.
	cv_mvda3	12	28.6	27.7
	cv_mvda5	12	33.8	34.6
	cv_mvda10	12	31.7	34.5
	cv_mvda15	12	34.2	32.5
	cv_mvda20	12	34.2	32.5

Tabela15- Coeficientes de variação no grupo de tumores serosos e número de campos.

	Variable	N	Mean	Median
	cv_aendm1	0	.	.
	cv_aendm3	12	22.5	18.3
	cv_aendm5	12	25.5	24.3
	cv_aendm10	12	33.5	30.9
	cv_aendm15	12	36.6	34.0
	cv_aendm20	12	49.7	34.9
	cv_aendt1	0	.	.
	cv_aendt3	12	28.0	25.4
	cv_aendt5	12	34.7	32.2
	cv_aendt10	12	36.8	30.7
	cv_aendt15	12	42.0	38.5
	cv_aendt20	12	51.9	37.8
	cv_aendp1	0	.	.
	cv_aendp3	12	22.9	21.1
Grupo seroso	cv_aendp5	12	32.1	31.5
	cv_aendp10	12	35.6	29.1
	cv_aendp15	12	40.3	38.3
	cv_aendp20	12	38.8	36.0
	cv_mvdm1	0	.	.
	cv_mvdm3	12	21.6	16.5
	cv_mvdm5	12	31.8	30.2
	cv_mvdm10	12	45.4	36.4
	cv_mvdm15	12	48.0	43.1
	cv_mvdm20	12	53.0	48.7
	cv_mvda1	0	.	.
	cv_mvda3	12	23.4	21.4
	cv_mvda5	12	32.5	37.5
	cv_mvda10	12	32.2	30.0
	cv_mvda15	12	31.5	26.8
	cv_mvda20	12	32.4	27.2

7- DISCUSSÃO

7.1- Influência do formato de imagem

No presente trabalho, a influência do formato de captura/armazenamento de imagem sobre valores de quantificação de angiogênese foi avaliado através do índice de concordância intraclasses (ICC). Essa avaliação foi realizada com intuito de verificar se dados numéricos obtidos a partir imagens comprimidas (JPEG) diferem muito de dados extraídos de imagens TIFF e, na eventualidade das diferenças serem expressivas, se há possibilidade de interconversão de valores (ou seja, obtenção de valores TIFF a partir de valores JPEG), por meio de modelos de predição (funções matemáticas). Alguma diferença entre os formatos já era esperada, uma vez que nas imagens JPEG o processo de compressão (que permite a redução do tamanho do arquivo, otimizando a captura e a estocagem em memória) leva a perda aleatória de pixels e conseqüentemente de informações necessárias aos cálculos histomorfométricos. Em função desta possibilidade de perda de informações, muitos recomendam evitar o uso de imagens comprimidas em estudos morfométricos, embora não forneçam a devida demonstração da existência e magnitude deste risco de perda^{55,56}.

Recentemente, alguns autores têm questionado essa orientação, argumentando que, em certas condições, a falta de precisão de valores obtidos de imagens comprimidas não seria suficiente para comprometer a fidedignidade das análises^{55,56}. Mesmo que a diferença entre TIFF e JPEG fosse significativa, o que impediria a comparação direta destes dois tipos de imagem (ou o seu uso indiscriminado em um estudo), a confirmação de uma relação linear entre esses formatos permitiria a interconversão de valores. Isso, por sua vez, fomentaria o uso em larga escala de imagens comprimidas que têm como principal vantagem o menor tamanho do arquivo (o que agiliza a captura e as rotinas de processamento e análise de imagem, além de representar uma grande economia em termos de ocupação de memória, seja a da câmera ou a do computador).

No presente trabalho, observou-se uma concordância “quase perfeita” ($ICC > 0,75$) entre TIFF e os diferentes tipos de JPEG, em quase todas as variáveis de quantificação vascular consideradas. Nesse sentido, os valores máximos de

ICC ocorrem nas análises de MVDm e AEnd% (independentemente do tipo de JPEG considerado) e nas comparações entre TIFF e JPEGfine (independentemente da variável de quantificação avaliada). Já as principais exceções à observação de concordância elevada ocorrem quando se comparam: TIFF e JPEGhigh (nas variáveis AEndm e AEndt); TIFF e JPEGlow (em MVDa, AEndm e AEndt); e TIFF e JPEGbasic (em MVDa e AEndt). Nestes casos, os ICCs são inferiores a 0,75, indicando menor grau de concordância. Contudo, após a eliminação de valores “outliers”, durante a análise de correlação, a maioria dessas exceções deixa de existir com o aumento significativo do ICC para valores “quase perfeitos”. Persistem com ICC abaixo de 0,8 as comparações entre TIFF e JPEGs de baixa qualidade ou alta compressão (JPEG low e basic) para valores obtidos através da variável MVD automático. Mesmo assim, nesses casos, valores próximos do esperado para TIFF podem ser obtidos a partir desses tipos de JPEG (low e basic), através da aplicação de modelos de conversão que garantem ajustes ao redor de 77%.

Com bases nesses achados, podemos afirmar que não se justifica a recomendação atual de se evitar o uso de imagens comprimidas do tipo JPEG, em estudos de quantificação de angiogênese por método histomorfométrico. Entretanto, quando se optar pela utilização de imagens JPEG (pelos benefícios delineados acima), deve-se dar preferência ao uso de JPEGs de baixa compressão (alta qualidade) e das variáveis de quantificação vascular “MVDm” e “AEnd%”, por questões de precisão e reprodutibilidade.

7.2- Influência do número total de campos

Com o objetivo de avaliar a influência do número total de campos sobre as variáveis de quantificação vascular, bem como determinar o número mínimo de campos necessário a uma análise de angiogênese fidedigna, procedemos ao cálculo dos valores médios de vascularização em conjuntos de 1, 3, 5, 10, 15 e 20 campos, construindo, em seguida, uma curva com esses valores. A expectativa

era de que com o aumento da amostragem (i.e., do número de campos), os valores médios de quantificação vascular aumentassem ou diminuíssem, se aproximando da média da população (média do total de campos “hotspots” do corte histológico), ou seja, entrando em um platô de estabilização. Também era esperado que as medidas de dispersão em torno da média (coeficientes de variação) diminuíssem a medida que a média dos campos se aproximasse à média do total de campos do corte histológico, estabilizando por sua vez em valores inferiores a 10^{57} .

Entretanto, nenhuma das hipóteses aventadas pôde ser confirmada. Em todas as variáveis de quantificação vascular consideradas, a curva “número de campos x valor médio de vascularização” sofre poucas modificações à medida que o número de campos aumenta. Além disso, nenhuma das modificações nos valores médios atinge significância estatística. Vale destacar que a ausência de modificações proeminentes na angulação da curva é consistente principalmente a partir do conjunto de 3 campos. Embora esses dados pareçam indicar uma estabilização precoce da curva (já em 3 campos), deve-se atentar para o fato do coeficiente de variação não diminuir significativamente ao longo da curva, mantendo-se em valores elevados (acima de 20)⁵⁷.

Interroga-se se a heterogeneidade biológica da amostra (ao se incluir tumores benignos, “borderline” e malignos) bem como a própria heterogeneidade dos hotspots vasculares não poderiam, em conjunto, mascarar variações significantes entre os conjuntos de campos. De qualquer forma, o mais importante é que, na presença de coeficientes de variação elevados em todo o segmento da curva considerado, não se pode afirmar com segurança que a curva tenha atingido o platô de estabilização⁵⁷. Para confirmar esta hipótese, seria necessário aumentar o número de campos analisados, isto é, analisar conjuntos com mais de 20 campos, o que, por sua vez, ultrapassaria o escopo do presente trabalho. Para aumentar a factibilidade da tarefa de analisar conjuntos maiores que 20 campos, seria interessante o uso de equipamentos atuais de digitalização de corte histológico total (como “scanners” de lâminas e microscópios com motorização de charriot).

Em síntese, não foi possível caracterizar a influência do número campos de análise sobre os valores de quantificação vascular. Em um universo amostral de 20 campos de médio aumento, independentemente da variável de quantificação vascular avaliada, não foi possível caracterizar com segurança uma curva com platô de estabilização, tão pouco um N mínimo de campos de análise capaz de garantir uma análise fidedigna.

8- CONCLUSÕES

- O impacto do formato de imagem sobre a quantificação de parâmetros de angiogênese em tumores epiteliais ovarianos pode ser considerada pequena, já que a concordância entre imagens TIFF e JPEG é elevada. Constitui exceção o contraste TIFF vs. JPEGs de baixa qualidade, na variável MVDa (densidade microvascular automática). Mesmo nesse caso, a interconversão de valores pode ser realizada através de modelos de predição devidamente estabelecidos neste trabalho.
- Quando se optar pela quantificação de angiogênese a partir de imagens em formato comprimido, deve-se preferir o uso de JPEGs de alta qualidade e das variáveis MVDm (densidade microvascular manual) e AEnd% (área endotelial percentual), a fim de se garantir uma análise mais fidedigna e precisa.
- Não foi possível caracterizar a influência do número campos de análise sobre os valores de quantificação vascular. No universo amostral avaliado, não foi possível caracterizar uma curva com platô de estabilização que permitisse a estimativa de N mínimo de campos capaz de garantir uma análise de angiogênese em tumores ovarianos epiteliais fidedigna. Para aumentar a factibilidade da tarefa de analisar conjuntos maiores que 20 campos, seria interessante o uso de equipamentos atuais de digitalização de corte histológico total (como “scanners” de lâminas e microscópios com motorização de charriot).

9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistic, 2005. CA Cancer J Clin 2005;55:10-30.
- 3- Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Am J Pathol. 1995;147:33-41.
- 4- Green HSN. Heterologous transplantation of mammalian tumours. The transfer of human tumours to alien species. J Exp Med 1941;73:461-8.
- 5- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971;285:1182-6.
- 6- Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. Ann Surg 1972;175:409-16.
- 7- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990;82:4-6.
- 8- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1995;1:27-31.
- 9- Krebel RS. Tumour angiogenesis: past, present and the near future. Carcinogenesis 2000;21:505-15.
- 10- Sharma RA, Harris AL, Dalglish AG et al. Angiogenesis as a biomarker and target in cancer chemoprevention. Lancet Oncol 2001;2:726-31.
- 11- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem 1992;267:10931-34.
- 12- Risau W. Differentiation of endothelium. FASEB J 1995;9:926-933.
- 13- Roland D, Ferder M, Kothuru R, Faierman T, Strauch B. Effects of pulsed magnetic energy on a microsurgically transferred vessel. Plast Reconstr Surg. 2000;105:1371-4.

- 14- Folkman J, Klagsbrun M. Vascular physiology: a family of angiogenic peptides. *Nature* 1987;329:671-2.
- 15- Garner A. Vascular diseases. In Garner A, Klintworth GK (Eds.). *Pathobiology of ocular disease. A dynamic approach*, 1625-1710. 2nd Edition, New York, Marcel Dekker, 1994.
- 16- Schoell WM, Pieber D, Reich O, Lahousen M, Janicek M, Guecer F, Winter R. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in ovarian carcinoma: quantification of endothelial immunoreactivity by image analysis. *Cancer*. 1997;80:2257-62.
- 17- Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoral microvessel density in human solid tumours. *British Journal of Cancer* 2002;86:1566-77.
- 18- Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Sem Diag Pathol* 1993;10:302-313.
- 19 Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Belien JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*. 2002; 38:1564-79.
- 20- Offersen BV, Borre M, Overgaard. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. *European Journal of Cancer* 2003;39:881-90.
- 21- Boyle J. Histological measurement of tumour angiogenesis. *European Journal of Cancer* 2003;39:859-60.
- 22- Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology*. 2005;46:481-9.

- 23- Rasila KK, Burger RA, Smith H, Lee FC, Verschraegen C. Angiogenesis in gynecological oncology - mechanism of tumor progression and therapeutic targets. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:710-726.
- 24- Amis SJ, Coulter-Smith SD, Crow JC, Maclean AB, Perrett CW. Microvessel quantification in benign and malignant ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15:58-65.
- 25- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *European Journal of Cancer* 1996;32:2474-84.
- 26- Vieira SC, Zeferino LC, Da Silva BB, Aparecida Pinto G, Vassallo J, Carasan GA, De Moraes NG. Quantification of angiogenesis in cervical cancer: a comparison among three endothelial cell markers. *Gynecol Oncol*. 2004; 93:121-4.
- 27- Weidner N. The importance of tumor angiogenesis. *Am J Clin Pathol* 2004;122:675-77.
- 28- Weidner N, Semple P, Welch W, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis. Correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med* 1991;324:1-6.
- 29- Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;36:169-80.
- 30- Nakayama K, Kanzaki A, Takebayashi Y, Toi M, Bando H, Nabei T, Miyazaki K, Fukumoto M. Different features of angiogenesis between ovarian and breast carcinoma. *Cancer Lett*. 2001 ;170:161-7.
- 31- Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in primary and metastatic epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:541-7.

- 32- Gasparini G. Angiogenesis research up to 1996. A commentary on the State of Art and suggestions for future studies. *Eur J Cancer* 1996;32A:2379-85.
- 33- Brustmann H, Riss P, Naude S. The relevance of angiogenesis in benign and malignant epithelial tumors of the ovary: a quantitative histologic study. *Gynecol Oncol.* 1997;67:20-6.
- 34- Emoto M, Iwasaki H, Mimura K, Kawarabayashi T, Kikuchi M. Differences in the angiogenesis of benign and malignant ovarian tumors, demonstrated by analyses of color Doppler ultrasound, immunohistochemistry, and microvessel density. *Cancer.* 1997; 80:899-907.
- 35- Orre M, Lofti-Miri M, Mamers P, Rogers PAW. Increased microvessel density in mucinous compared with malignant serous and benign tumours of the ovary. *British Journal of Cancer* 1998; 77: 2204-9.
- 36- Orre M, Rogers PA. VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, microvessel density and endothelial cell proliferation in tumours of the ovary. *Int J Cancer.* 1999; 84:101-8.
- 37- Alvarez AA, Krigman HR, Whitaker RS, Dodge RK, Rodriguez GC. The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999;5:587-91.
- 38- Obermair A, Wasicky R, Kaider A, Preyer O, Losch A, Leodolter S, Kolbl H. Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett.* 1999;138:175-82.
- 39- Heimburg S, Oehler MK, Papadopoulos T, Caffier H, Kristen P, Dietl J. Prognostic relevance of the endothelial marker CD 34 in ovarian cancer. *Anticancer Res.* 1999;19:2527-9.
- 40- Wang Z, Wang H, Lin M. Study on tumor angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma. *J Tongji Med Univ.* 2000;20:172-4.

- 41- Ogawa S, Kaku T, Kobayashi H, Hirakawa T, Ohishi Y, Kinukawa N, Nakano H. Prognostic significance of microvessel density, vascular cuffing and vascular endothelial growth factor expression in ovarian carcinoma: a special review for clear cell adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 2002;176:111-8.
- 42- Goodheart MJ, Vasef MA, Sood AK, Davis CS, Buller RE. Ovarian cancer p53 mutation is associated with tumor microvessel density. *Gynecol Oncol.* 2002; 86:85-90.
- 43- Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Boddi V, Baroni G, Taddei A, Taddei GL. COX-2 status in relation to tumor microvessel density and VEGF expression: analysis in ovarian carcinoma patients with low versus high survival rates. *Oncol Rep.* 2004;11:309-13.
- 44- Sonmezer M, Gungor M, Ensari A, Ortac F. Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer: in association with transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor. *Int J Gynecol Cancer.* 2004;14:82-8.
- 45- Blok R, Blok K, Jelen M, Grybos M. Analysis of prognostic factors for the extent of vascularity of serous ovarian cancer on the basis of CD34 antigen expression. *Ginekol Pol.* 2004;75:91-8.
- 46- Giatromanolaki A, Sivridis E, Tsikouras P, Manavis I, Maroulis G, Koukourakis MI. Angiogenesis and vascular survival ability in ovarian adenocarcinomas. *Virchows Arch.* 2004 ;445:521-6.
- 47- Ali-Fehmi R, Morris RT, Bandyopadhyay S, Che M, Schimp V, Malone JM Jr, Munkarah AR. Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and survival. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:819-25.

- 48- Raspollini MR, Castiglione F, Garbini F, Villanucci A, Amunni G, Baroni G, Boddi V, Taddei GL. Correlation of epidermal growth factor receptor expression with tumor microdensity vessels and with vascular endothelial growth factor expression in ovarian carcinoma. *Int J Surg Pathol.* 2005; 13:135-42.
- 49- Goodheart MJ, Ritchie JM, Rose SL, Fruehauf JP, De Young BR, Buller RE. The relationship of molecular markers of p53 function and angiogenesis to prognosis of stage I epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:3733-42.
- 50- Chan JK, Magistris A, Loizzi V, Lin F, Rutgers J, Osann K, DiSaia PJ, Samoszuk M. Mast cell density, angiogenesis, blood clotting, and prognosis in women with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2005;99:20-5.
- 51- Novichkov EV, Votintsev AA. Quantitative characteristics of stromal components in prognosis of ovarian cancer recurrences. *Arkh Patol.* 2005; 67:29-31.
- 52- Karavasilis V, Malamou-Mitsi V, Briasoulis E, Tsanou E, Kitsou E, Pavlidis N. Clinicopathologic study of vascular endothelial growth factor, thrombospondin-1, and microvessel density assessed by CD34 in patients with stage III ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16 Suppl 1:241-6.
- 53- Taskiran C, Erdem O, Onan A, Arisoy O, Acar A, Vural C, Erdem M, Ataoglu O, Guner H. The prognostic value of endoglin (CD105) expression in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16:1789-93.
- 54- Olímpio, AY. Expressão da ciclo-oxigenase e do Ki67 em tumores benign, *borderline* e maligno do ovário [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.
55. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.

56. Montgomery DC e Peck EA. (1982). Introduction to Linear Regression Analysis. John Wiley & Sons Inc. New York.
57. Fonseca JS e Martins GA. (1994). Curso de Estatística. 5ª ed. Editora Atlas. São Paulo.
58. Khattree R e Naik DN. (1995). Applied Multivariate Statistics with SAS Software. SAS Institute Inc. Cary. NC.
59. Olímpio AY (2006). Expressão da ciclo-oxigenase e do Ki67 em tumores benign, *borderline* e maligno do ovário [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas.

PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

- 1- SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA.
- 2- SPSS for Windows, versão 10.0. SPSS Inc, 1989-1999, Chicago, Illinois, USA.