

VALCINIR BEDIN

***PARÂMETROS DE TEXTURA DA CROMATINA COMO
FATOR PROGNÓSTICO EM CARCINOMA BASOCELULAR***

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica do(a) aluno(a) Valcinir Bedin

Campinas, 29 de julho de 2004

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

CAMPINAS

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

VALCINIR BEDIN

***PARÂMETROS DE TEXTURA DA CROMATINA COMO
FATOR PROGNÓSTICO EM CARCINOMA BASOCELULAR***

*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 Anatomia
Patológica.*

ORIENTADOR: PROF. DR. KONRADIN METZE

CAMPINAS

2004

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

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

Membros:

1. Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

2. Profa. Dra. Maria Letícia Cintra

3. Prof. Dr. Konradin Metze

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

Data: 29/07/2004

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todos aqueles que,
por não entenderem o significado da
palavra ciência , a ela se opõem .*

*Para que eles possam ser iluminados e
perceberque o porvir só aos sábios
pertence.*

AGRADECIMENTOS

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

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

A Profa. Dra. Maria Leticia Cintra, que soube me compreender e cuja ajuda foi imprescindível.

A Sra Maria do Carmo Machado, sempre presente nas minhas necessidades, até nas emocionais.

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

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

Aos meus alunos, pelo estímulo indireto.

os pacientes, que, sem os quais este trabalho não existiria.

*Mas onde se achará a sabedoria? E onde está o lugar da inteligência?
O homem não lhe conhece o valor; não se acha na terra dos viventes.
Donde pois vem a sabedoria e onde está o lugar da inteligência?
Mas disse ao homem: Eis que o temor do Senhor é
sabedoria e apartar-se do mal é a inteligência.*

Livro de Jó, Cap.28, Bíblia Sagrada

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1-INTRODUÇÃO.....	15
1.1-O Carcinoma Basocelular.....	16
1.2-A análise da Imagem.....	19
1.3-Justificativa do Trabalho.....	23
2-OBJETIVOS.....	24
2.1-Gerais.....	25
2.2-Específicos.....	25
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1-Casuística.....	27
3.2-Métodos.....	28
3.2.1-Preparo da Lâmina.....	28
3.2.2-Análise das populações celulares.....	29
3.2.2.1.Microscopia óptica.....	29
3.2.2.2.Aquisição das imagens.....	29
3.2.3-Parâmetros extraídos.....	31
3.2.4.Análise quantitativa e qualitativa	33
3.2.4.1.Análise quantitativa.....	33
3.2.4.2.Análise qualitativa.....	33
3.3. Aprovação pelo Comitê de Ética.....	34
4-RESULTADOS.....	35
5-DISCUSSÃO.....	39
6-CONCLUSÃO.....	46
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
8-ANEXO.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

CBC	Carcinoma basocelular
FFT	“Fast Fourier Transformed” (Transformada de Fourier)
PIXEL	“picture element” (menor ponto da imagem)
BIPMAT	Tipo de representação de imagem no qual cada ponto da imagem é associado a um valor

LISTA DE TABELAS

	<i>PAG.</i>
TABELA 1-	
Dados relativos a biopsias e pacientes sem recidiva-Anexo 1..	57
TABELA 2-	
Dados relativos a biopsias e pacientes com recidiva-Anexo 2.	59

LISTA DE FIGURAS

	<i>PÁG.</i>
FIGURA 1- Senos, Obtenção da onda quadrada a partir dos senos e Soma dos Senos.....	20, 21
FIGURA 2- Transformada de Fourier.....	21
FIGURA 3- Núcleo submetido a Transformada de Fourier.....	22
FIGURA 4- Fotografia de núcleos de carcinoma basocelular.....	30
FIGURA 5- Alisamento das bordas nucleares.....	32
FIGURA 6- Diagrama da disposição dos setores.....	34

RESUMO

Vários estudos sobre os aspectos histológicos do carcinoma basocelular (CBC) foram realizados tentando correlacioná-los à agressividade local, porém são técnicas trabalhosas, de difícil execução e custosas. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer diferenças entre a textura nuclear de tumores recidivantes (CBCR) e não recidivantes (CBCNR). Para tanto utilizamos um programa de computador desenvolvido pelo Instituto de Computação da Unicamp, com a assessoria do Departamento de Anatomia Patológica da mesma Universidade, para correlacionar esses achados ao comportamento biológico do tumor. Foram feitos, em 98 casos de carcinoma basocelular com acompanhamento mínimo de 5 anos, a avaliação da textura de cromatina do núcleo (no mínimo 100 por caso) através da transformada de Fourier, e a sua correlação com recidiva. Numa análise multivariada cox testamos relevância prognóstica de variáveis derivadas da transformada de Fourier junto com fatores preditivos conhecidos tais como tipo histológico e distância a margem cirúrgica. Obtivemos um modelo prognóstico onde variáveis derivadas da transformada de Fourier entraram como fatores prognósticos independentes além dos fatores prognósticos já conhecidos. Portanto a análise computadorizada da cromatina em lâminas histológicas de rotina de carcinoma basocelulares permite diferenciar diferentes graus de agressividade independentemente do grau histológico ou da distância até a margem cirúrgica. O resultado nos mostrou que, através da utilização de um programa de computador de fácil utilização podemos acrescentar mais um instrumento ao arsenal disponível ao patologista.

ABSTRACT

Basal cell carcinomas (BCCs) usually follow a rather benign clinical course. A part of them however recurs after treatment causing a local tissue destruction. Therefore, morphological parameters that could help to distinguish between recurrent and non recurrent BCCs would be interesting. The aim of our study was to investigate whether morphometric variables of the nuclei in routinely stained histological sections and the chromatin texture could be helpful to identify patients with high risk for recurrence. We used a computer program specially developed by the Computer Institute of the UNICAMP (State University of Campinas-SP-Brazil) in association of the Pathology Department of the same university. We studied 98 BCC cases (52 non recurrent and 46 recurrent) with at least 60 months follow-up. In all cases we performed FFT (Fast Fourier Transform) in, at least, 100 nuclei of each case.

Then we correlated the FFT results with others predictive factors as histological types and surgical margin distance. We obtained a prognosis model where the Fast Fourier Transform results play an independent role besides the already known predictive factors.

As a result we can assure that the computerized chromatin analysis performed in histological routine slides is able to differentiate different aggressiveness degrees in BCCs independent from the histological type or from the surgical margin distance.

Our aim is to show that we can use a friendly user computer program as a novel instrument to the pathologist arsenal.

1-INTRODUÇÃO

1.1-O CARCINOMA BASOCELULAR (CBC)

O carcinoma basocelular (CBC) é o câncer cutâneo mais comum nos humanos.(FLEMING ID, 1995) Representa 67,5% dos tumores de pele e geralmente apresenta curso benigno, crescendo lentamente e desenvolvendo-se apenas localmente. Entretanto alguns exemplares de CBC mostram comportamento agressivo, rapidamente infiltrando estruturas profundas(MILLER SJ, 1991). Os critérios histológicos tradicionais, (SEXTON M, 1990) que incluem tamanho do tumor, ou dos brotos neoplásicos, (HAUBEN DJ, 1982) taxa mitótica, padrão nuclear (DIXON AY,1989), hialinização do estroma e disposição celular periférica em paliçadas (GOODING CA, 1965) foram de pouco valor em discriminar inequivocamente o CBC agressivo do não agressivo (DIXON AY, 1993). Conseqüentemente, através das duas últimas décadas, muitos outros fatores morfológicos e biológicos continuaram sendo investigados, como algumas características morfométricas (TAYLOR GA, 1973), número de regiões organizadoras nucleolares (METZE K, 2000), (METZE K, 1991), (METZE K 7 LORAND-METZE, 1992). (METZE K, LORAND-METZE, 1993) (METZE K, LORAND-METZE, 1999) (METZE K, TREVISAN M, 1999), expressão da proteína p53 (LORAND-METZE, 1999), indicadores de taxa de apoptose (JAHODA CAB, 1991) como a expressão da proteína bcl-2 (HALL PA, 1990), expressão de moléculas de adesão (WEINSTEIN GD, 1970) e marcadores de proliferação celular (GRIMWOOD RE,1986). Entretanto a análise morfométrica computadorizada foi pouco estudada e a avaliação dos autores é de que a avaliação morfométrica pode trazer grande contribuição ao conhecimento destes tumores e ao seu grau de agressividade.

RECORRÊNCIA EM CBC

Os Índices de recorrência em CBC variam de 4 a 14% dos casos (KARAGAS MR, 1992) (EPSTEIN E, 1973). Existem estudos mostrando recorrências após longos períodos de remissão. (ROWE DE, 1989) (CZARNECKI D, 1996). Alguns fatores de risco foram citados, mas são variados (DUBLIN N, 1983) mas a predictibilidade da recorrência e agressividade ainda está mais restrita ao tipo histológico. (JACOBS GH, 1982).

Os estudos publicados sobre recorrência em CBC baseiam-se quase que exclusivamente na ação cirúrgica, quer seja na abordagem da margem de segurança cirúrgica (GOODING, 1965) (DE SILVA SP, 1985), exereses incompletas (RICHMOND,

1987), tipos de técnicas cirúrgicas (EMMETT AJJ,1990) (SILVERMAN MK, 1992), estudos da cicatrização (DVORAK H, 1986), indicação de tipo de cirurgia não adequada (LANG PG, 1986) ou formas não cirúrgicas de tratamento (WILDER RB,1991).

Os trabalhos relacionados a fatores preditivos de recorrência de CBC (DIXON AY, 1989) repetidamente fazem alusão ao tipo histológico (ROBINSON JK,1987) (MARGHOOD A, 1993) (KARAGAS MR, 1992), mesmo quando em estudos prospectivos de longas duração.

O estudos de imagens

A forma mais comum de se processarem as imagens tem como princípio trabalhar com elas diretamente, como nós as vemos, isto é, concentrando o trabalho na intensidade e na distribuição dos graus de cinza ao nível de cada ponto da figura. Estes métodos são referidos como métodos espaciais. Assim, inúmeras informações podem ser retiradas, tais como distância entre dois pontos, áreas, ângulos, (GONZALES RC, 1987) contagem de elementos como células, núcleos, mitoses, entre outros.(THUNNISSEN FBJM, 1986)

A análise da imagem pelo computador pode prever a sobrevivência de pacientes com neoplasias malignas com um alto grau de acurácia e com menos subjetividade que o exame visual (CANZONIERI V, 1995). Contudo, não se deve entender patologia quantitativa como sinônimo de diagnóstico automático, nem que a responsabilidade do patologista deva ser assumida sobre os aplicativos computacionais.

Há mais de 30 anos, vários sistemas experimentais foram desenvolvidos para o prescreening de preparados citológicos, incluindo uso de técnicas de processamento de imagens (HARALICK RM, 1973). Apesar do grande número de algoritmos desenvolvidos, ainda nenhum dos sistemas resultou num produto comercial clinicamente aceitável. Imagens de células coradas são heterogêneas e complexas, e pode ser difícil classificá-las devido à grande quantidade de agregados celulares e superposições.

O processamento automático de imagens e a quantificação de características morfológicas de células têm um duplo benefício. Primeiro, o processo pode permitir screening automatizado e, segundo, tomar os critérios de diagnósticos mais objetivos e reprodutíveis (MORRIS JA, 1994).

Os parâmetros da análise de imagem podem ser usados com a vantagem de estimular pequenas mudanças na substância celular que não são óbvias ao olho humano, ou são invisíveis, ou são difíceis de incluir numa descrição qualificativa (STEPHENSON TJ, 1992). Há estruturas vistas na microscopia óptica e eletrônica que não poderiam ser rapidamente classificadas pelo uso de parâmetros simples como comprimento, área e circunferência, especialmente se sua aparência geral puder ser descrita através de características texturais (VAN GOOL, 1985).

Os recursos disponíveis em programas comerciais (por exemplo, KS-300) restringem-se a parâmetros morfométricos elementares, tais como diâmetro, área, perímetro (TRUE LD, 1996), que por se ajudam objetivar, porém, não conseguem “medir” conjuntos morfológicos mais complexos, como, por exemplo, a textura de núcleos. Considerando que uma digital de um núcleo é composta por pixels com graus de cinza formando um padrão, a textura nuclear depende da relação espacial de cada pixel com os pixels vizinhos no núcleo. Assim, as medidas de textura são propriedades estatísticas locais de uma imagem.

A textura é uma característica que descreve a aparência genética de parte de uma imagem, e é freqüentemente expressa como aparência macia, arenosa, regular, linear, grosseira, granular, etc. Matematicamente, a textura pode ser descrita em termos da ocorrência de regularidades pequenas e locais. O conjunto de parâmetros descrito destas regularidades é usado na análise de textura de imagens, cada uma com sua vantagem própria.

A textura é uma propriedade que expressa a distribuição e a inter-relação espacial entre os vários graus de cinza que compõem um objeto. Muitos descritores de textura foram usados em estudos citológicos para a análise da distribuição nuclear da cromatina.

Características texturais são, portanto, parâmetros que podem ser calculados a partir da textura de uma imagem armazenada na memória de um computador (HARALICK RM, 1973). Essas ferramentas já foram comprovadas como úteis na quantificação de substâncias celulares e conteúdo de DNA nuclear. Com o advento da análise de imagem digital, novos caminhos foram abertos para abordar esse assunto. Como a textura da cromatina dos núcleos está relacionada com a função celular, vários parâmetros foram

usados com sucesso em núcleos fixados e corados para distinguir células entre si. Pode-se citar, por exemplo, as técnicas para se calcular heterogeneidade, “run-lengths”, condensação, contraste, “coarseness” e índice de gradiente de contraste (SPINA, 1992).. O tamanho, a forma e a textura dos núcleos são de fundamental importância na avaliação citológica de malignidade. Contudo, a interpretação destas características é propensa a considerável variação subjetiva entre os patologistas. As características nucleares favorecendo malignidade incluem cromatina hipercromática, irregularmente distribuída, grosseira, com marginação da cromatina e clareamento da paracromatina, com membrana nuclear irregular e angulada, e nucléolos grandes, múltiplos e irregulares. Numerosos estudos demonstraram a habilidade das análises da imagem nuclear para discriminar acuradamente entre células benignas e malignas.

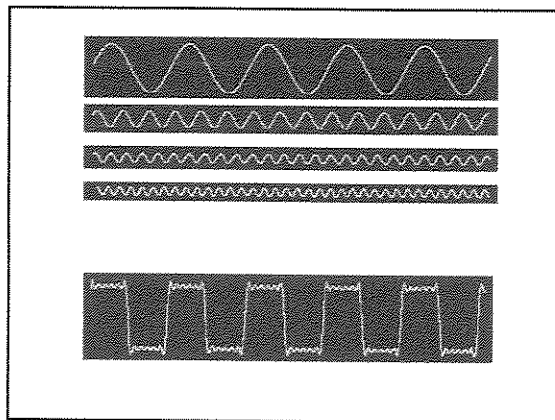
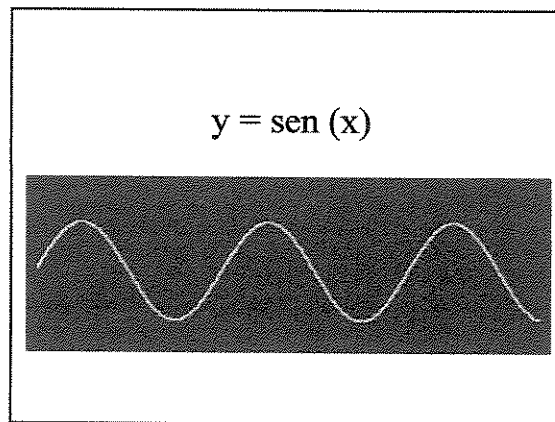
A avaliação da distribuição da cromatina nuclear ou textura se impõe como um desafio para o patologista. Em geral, alguém pode referir-se à cromatina descrevendo se ela é uniformemente dispersa ou agrupada de maneira fina ou grosseira. Alguns simplificam o conceito de textura nuclear, denominando as áreas escuras como cromatina e as áreas claras como paracromatina. Na realidade, existem sutis variações na estrutura nuclear correspondendo a alterações graduais na distribuição espacial da cromatina, incluindo o aparecimento de cromocentros focalmente, e de um ou mais nucléolos. Muitas abordagens foram desenvolvidas para quantificar a textura em imagens digitais, incluindo estatísticas digitais, incluindo estatística simples, estatística markoviana, (PRESSMAN, 1976) análise de gradientes, análise granulométrica, transformada de Fourier e análise fractal.

1.2-A ANÁLISE DE IMAGEM

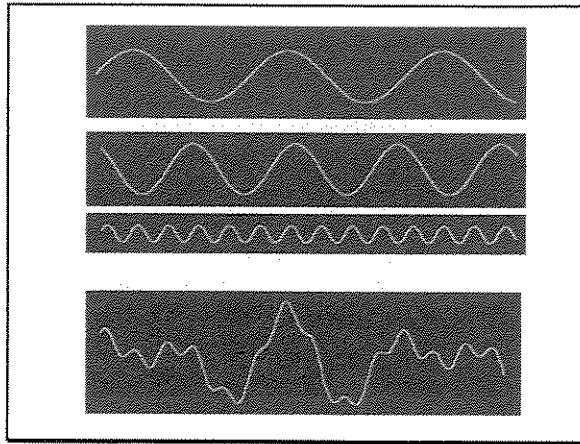
Perante esta problemática foram procurados e implantados parâmetros novos, tais como entropia, parâmetros de simetria (do contorno e da superfície) e a aplicação da teoria dos grafos (Wanderley de Souza Filho, tese de mestrado UNICAMP 1999).

Uma alternativa elegante para avaliar texturas é aquela em que se examina a composição da imagem como somas de senos e cossenos. Uma das primeiras tentativas nesse sentido foi a utilização da transformada de Fourier. Em 1808, Joseph Fourier propôs a

academia de ciências de Paris que toda curva irregular poderia ser como soma de funções periódicas. Já em 1809, Gauss, estudando as propriedades desta transformação, criou um algoritmo capaz de calculá-la exatamente e com maior desempenho, numa época em que não havia sequer calculadoras. Este algoritmo foi utilizado num computador pela primeira vez por Cooley apenas em 1969, em um programa escrito em FORTRAM. Assim, análise espectral tornou-se prática com o uso da transformada rápida de Fourier (FFT).



Obtenção da onda quadrada a partir dos senos



Soma de senos

FIGURA 1-

Transformada de Fourier

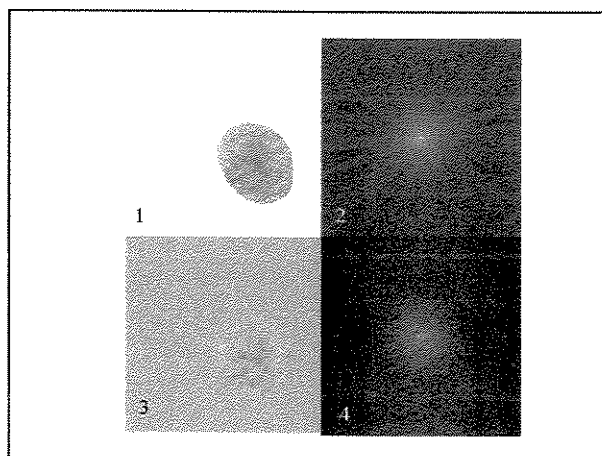
$$F(u, v) = \frac{1}{N} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) e^{-i2\pi \left(\frac{ux+vy}{N} \right)}$$

FIGURA 2-

As transformadas de Fourier já foram usadas em diversas áreas tais como cristalografia e teoria da comunicação, realizando, respectivamente, análise de estruturas tridimensionais e compressão de dados. Mais recentemente, as transformadas de Fourier foram empregadas para a identificação e classificação de pinturas, baseado na observação de que características particulares de uma pintura podem ser mais facilmente retiradas se o

espectro bidimensional for examinado, melhor que a pintura original. (MILES & JAGGARD, 1981)

A análise de Fourier transforma imagens do domínio espacial para o de frequência. (ROZYCKA, 1998) Geralmente se supõe que a frequência é a medida da repetição de algum evento periódico. Em processamento de imagem, a frequência espacial é a medida que expressa o ritmo das alterações de brilho (graus de cinza, geralmente entre 0 a 255) (STEPHENSON, 1992) (CASTLEMAN, 1979) que ocorrem numa seqüência de pontos. Altas frequências espaciais correspondem a detalhes de brilho que variam rapidamente. Baixas frequências espaciais representam mudanças lentas do brilho. A distribuição das frequências representa a periodicidade da imagem e as interferências direcionais. (MARCHEVSKY & BARTELS, 1994) As características de textura de Fourier podem ser calculadas a partir das distribuições das frequências em diferentes regiões do espaço transformado.



Núcleo submetido a Transformada de Fourier

FIGURA 3-

A análise computadorizada de imagens é um avanço no estudo da patologia uma vez que, através deste método, temos mais precisão nos diagnósticos que hoje são realizados e podemos avançar em diagnósticos até então não possíveis. Outra vantagem do método é poder diminuir a influência do subjetivismo no diagnóstico, reduzindo eventuais falhas humanas.

O entrave para a disseminação deste método é o seu alto custo, quer seja na aquisição de instrumental adequado, quer seja na elaboração e desenvolvimento de programas de computador acessíveis, tanto a nível de custos quanto a nível de execução do procedimento.

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura que usaram a Transformada de Fourier para estudos histológicos e todos poderiam ser melhorados. Banda-Ganboa em 1993, estudou células cervicais usando este instrumento. Como ainda não dispunha de tecnologia suficiente os efeitos da borda perturbaram o resultado final e não foi feita a análise da cromatina mas apenas do contorno nuclear. Smith em 1999 demonstrou com sucesso que a transformada de Fourier pode classificar a arquitetura histológica de tumores de próstata com 97,2% de acerto na graduação de Gleason nas imagens histológicas e 88,6% em esquemas feitos à mão. Utilizou o método da similaridade entre as imagens transformadas e não empregou nenhuma técnica de pré-processamento.

De Vries em 2000 estudou a organização dérmica nos casos de esclerodermia. Clark em 2001 explicou a transparência da córnea demonstrando diferenças ultraestruturais entre o tecido conjuntivo da córnea e da esclera, através da transformada de Fourier de imagens da microscopia eletrônica.

1.3-JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Alguns estudos (De ROSA G, 1990) (De ROSA G, 1992) (DOLAN OM, 1998) têm sustentado a hipótese da existência de um subgrupo de CBC com um fenótipo claramente agressivo, mas, ainda há a necessidade de se definir características que são importantes para o reconhecimento precoce dessas formas tumorais, antes da manifestação clínica de sua índole (recidiva).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é encontrar parâmetros histológicos que se correlacionem, precisamente, com o prognóstico, para assim, determinar quais os pacientes que apresentam alto risco de recidiva tumoral e que necessitam, desde o início, conduta cirúrgica mais invasiva e/ou acompanhamento mais próximo.

2-OBJETIVOS

2.1-GERAIS

O objetivo deste trabalho é estudar padrões de cromatina em células tumorais dos CBC agressivo e não agressivo através da análise de imagens da transformada de FOURIER para verificar seu possível envolvimento nos mecanismos patogénéticos das recidivas.

2.2-ESPECÍFICOS

Avaliação morfométrica computadorizada de núcleos e da cromatina das populações celulares através de programa de computador especialmente desenvolvido para gerar e analisar a transformada de FOURIER, e relacioná-la com o tempo livre de recidiva. Aprimorar as ferramentas disponíveis para esta finalidade.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-CASUÍSTICA

Foram selecionados 98 casos de carcinoma basocelular (CBC) (Código Snomed M80913, M80933, M80923 e M80903 em qualquer localização) de pacientes do HC- UNICAMP cujo número de prontuários oscilava entre 000001-1 e 260000-0 e que tenham sido acompanhados pelas especialidades de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e/ou Dermatologia por um período igual ou superior a cinco anos, a partir da exérese do tumor. Essas amostras tiveram que satisfazer os seguintes critérios:

Critérios de inclusão :

1. A biópsia ter sido encaminhada ao serviço de Anatomia Patológica – Unicamp e a amostra armazenada em bloco de parafina nos arquivos do serviço, ser localizada e encontrar-se em bom estado, para o processamento de novos cortes.
2. Representar exérese completa de tumor primário com margens cirúrgicas livres.
3. Ter seguimento por pelo menos 5 anos
4. Ter registro completo com as seguintes anotações : Registro do paciente; registro da biópsia; identificação da lâmina, identificação do paciente, data de nascimento, cor, sexo, área topográfica, data de retirada e diagnóstico.

Critérios de exclusão :

1. Bloco de parafina em mau estado de conservação
2. Comprometimento da margem na hora do recorte
3. Diagnóstico comprovado por segundo observador
4. Não ter diagnóstico de Síndrome do Nevo basocelular

Para obter um mínimo de poder estatístico na análise de regressão Cox , tentamos incluir no mínimo 40 casos com recidivas , pois recomenda-se no mínimo 10 casos com evento por variável testada na regressão de Cox .

O tempo livre de recidiva foi calculado em meses.

Em todos os casos foram extraídos os seguintes dados: registro do paciente, número da biopsia, identificação da lâmina, data de nascimento, idade, cor, sexo, tempo de observação do tumor, data da primeira retirada, maior diâmetro do tumor, menor diâmetro do tumor, menor margem do tumor, nível de Clark, nível de agressividade, topografia com relação ao sol e a área estética, localização em segmento cefálico ou não, tempo de aparecimento do tumor, recidiva (tabela 1) ou não (tabela 2) e tipo histológico. (anexos)

3.2-MÉTODOS

3.2.1-Preparação da lâmina

O procedimento de preparação das lâminas foi realizado no mesmo dia, para se evitar alterações com relação à qualidade dos reagentes e corantes, tentando minimizar ao máximo a variação da duração da coloração de cada lâmina, o tempo de exposição das lâminas coradas à luz, e a idade das lâminas.

Foram realizados 3 cortes (micrótomo Reichert-Jung), com 5µm, feitos pelo mesmo técnico, e coradas com HE seguindo as normas de coloração.

Coloração:

- Lavar em água corrente
- Imergir na hematoxilina por 5 minutos
- Mergulhar rapidamente no álcool 70° + HCl 2 ou 3 x
- Imergir em água por 1 minuto
- Imergir na eosina por 10 a 15 segundos
- Lavar rapidamente em água destilada
- Imergir em álcool 70° por 1 minuto

- Imergir no álcool 95° por 1 minuto, 2x
- Imergir no álcool absoluto por 1 minuto, 2 vezes
- Lavar rapidamente em xilol
- Imergir em xilol

Montagem

- Colocar 1 gota de bálsamo do Canadá em uma lâmina de microscópio
- Colocar a lamínula invertida sobre a lâmina
- Deixar secar a temperatura ambiente

3.2.2-Análise das populações celulares

3.2.2.1-Microscopia óptica

A análise das populações celulares foi feita com o auxílio de microscópio óptico (Carl Zeiss) com a objetiva de 100 aumentos Achroplan de imersão a óleo, com abertura numérica de 1,25.

3.2.2.2-Aquisição das imagens

Foi utilizado o sistema KS-300 para a aquisição interativa das imagens apresentando uma resolução espacial de 0,1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, dado obtido através da digitalização de uma régua micométrica de 1mm. As imagens foram salvas sem compactação no formato bitmap colorido de 24 bits (extensão .BPM), com o tamanho de 256X256 pixels. As imagens foram adquiridas pelo mesmo operador, que adotou os seguintes critérios para a seleção dos núcleos:

- a) Somente foram adquiridos núcleos com características de células neoplásicas, desprezando-se quaisquer outras células do campo.
- b) Apenas um núcleo por imagem. Havendo outros núcleos próximos, foram deixados incompletos, nas bordas das imagem, para que o programa segmentador pudesse elimina-los.

- c) Núcleos sem pregas, fendas e dobramentos.
- d) Núcleos sem superposição de qualquer estrutura, por exemplo, bolhas, precipitação de corante ou outros núcleos.
- e) Não foram adquiridas células em processo de divisão, exibindo cromossomos ou fuso mitótico. Uma ressalva pode ser feita neste momento, visto que núcleos em fase de duplicação do DNA (fase S e G2 e SG 1) não são facilmente distinguíveis pelo operador, sendo portanto passíveis de serem adquiridos.

Cada imagem nuclear foi adquirida no melhor foco, Isto é, no foco em que os contornos se apresentarem nítidos na maior parte do perímetro da carioteca.

Uma macro de comandos para aquisição de imagens do KS-300 foi elaborada para fornecer automaticamente os nomes de cada imagem, eliminando assim a possibilidade de erro nesta tarefa.

As imagens dos núcleos foram salvas diretamente em discos de transporte e, em seguida salvas em discos compactos especiais para computação. Foram gravados com auxílio do Laboratório de Informática da Faculdade de Ciências Médicas (FCM-UNICAMP), e do Laboratório de Sistemas de Informação (LIS-IC-UNICAMP)

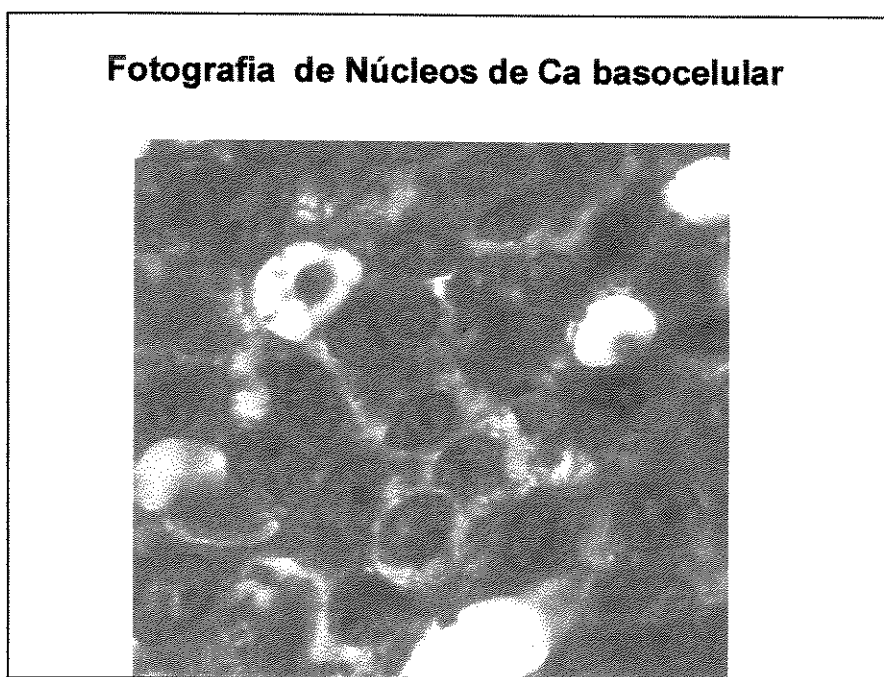


FIGURA 4-

3.2.3-Parâmetros extraídos

Os arquivos assim obtidos foram abertos pelo editor gráfico, e então os núcleos foram isolados em matrizes quadradas com 256 pixels de lado, e convertidos para o formato *bipmat* escala de cinzas, de 8 bits, através do cálculo da luminância. Esta conversão para escala de cinza é descrita como “perceptivelmente uniforme” (WOUVER, 2000), tendo a finalidade de simular o mesmo grau de variação de brilho da percepção visual humana em cores. Cada imagem foi submetida ao isolamento dos núcleos pela técnica de *thresholding* (GONZALES & WINTZ, 1987) pintando-se todo o fundo correspondente ao citoplasma e às outras células, sob visão direta do operador. O tom de cinza utilizado nesta operação é a média dos tons de cinza do núcleo estudado.

Foram utilizadas duas técnicas de tratamento da imagem para se realizar a segmentação:

- a) A imagem foi convertida em escala de cinzas de 8 bits, através do cálculo da luminância. Esta conversão para a escala de cinza é descrita como “perceptivelmente uniforme” (WOUVER, 2000), tendo a finalidade de simular o mesmo grau de variação de brilho da percepção visual humana em cores.
- b) Uma outra opção foi converter a imagem em escalas de cinzas de 8 bits, calculada a partir da soma de duas imagens: a luminância e a distância euclidiana no espaço de cores vermelho-verde-azul entre a cor de cada pixel com uma cor de referência, definível pelo usuário, geralmente uma cor que está presente nos contornos da imagem nuclear.

A primeira técnica é suficiente para segmentar a maioria das imagens nucleares. Em casos mais difíceis, quando a luminância não consegue distinguir os contornos nucleares, é utilizada a segunda técnica, que utiliza a informação da cor, além da luminância.

A seguir a imagem foi convertida numa imagem binária preto-e-branco, sendo realizado automaticamente:

1. a retirada das imagens nucleares presentes nas bordas da imagem.

2. o fechamento por área dos “buracos” existentes na componente conexa, menores que 1500 pixels
3. a abertura por área retirando-se as componentes conexas menores que 3500 pixels.

O resultado é uma máscara binária que representa a imagem nuclear. As imagens coloridas de 24 bits assim segmentadas, com fundo branco, foram então gravadas em um outro disco compacto.

Para preparar a imagem para ser transformada pela FFT, a imagem é convertida em escala de cinzas através do cálculo de luminância, e o fundo branco é substituído pela luminância média do núcleo. A seguir, é realizado a supressão das discontinuidades abruptas das bordas do núcleo, utilizando-se a técnica de amaciamento, utilizando um filtro de média com vizinhança 8 (RANDAL ADAM, dissertação de mestrado-Unicamp-DAP). A borda do núcleo foi selecionada através da subtração da máscara binária de 12 dilatações pela de 3 erosões.

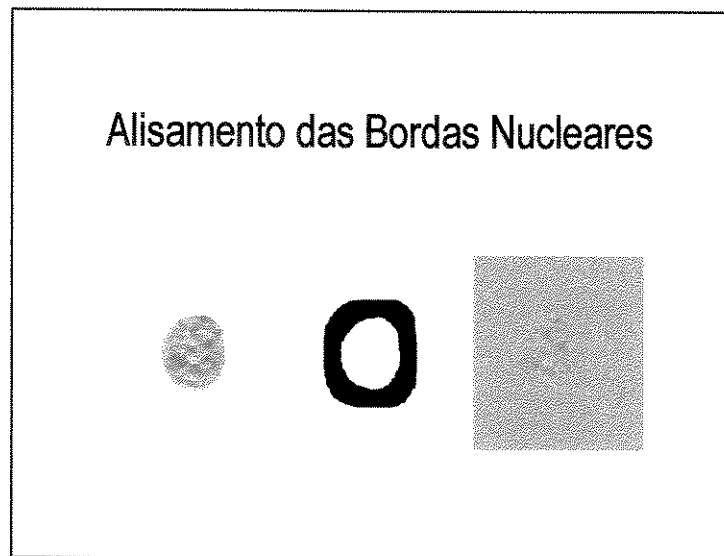


FIGURA 5-

Então a imagem está pronta para ser transformada pela FFT. Como a transformada de Fourier gera uma imagem onde cada pixel apresenta um componente real e um componente imaginário, é necessário que a imagem transformada seja calculada a partir de ambos os componentes.

A quantidade de detalhes na imagem transformada (resolução) é proporcional ao tamanho da imagem. Assim, imediatamente antes de se realizar o cálculo da transformada (Randall, tese de mestrado do Departamento de Anatomia Patológica), a imagem foi colocada dentro de outra, com 512 X 512 pixels, com o nível de cinza médio no background. Assim, a imagem do núcleo, que permanece inalterada, é processada numa matriz maior.

3.2.4-Análise quantitativa e qualitativa

3.2.4.1-Análise quantitativa

Na própria lâmina foram determinadas as medidas de distâncias (menor margem e distância mínima). Para tanto medimos as distâncias na lâmina e subtraímos da maior extensão da peça fixada. A distância mínima foi calculada em todas as margens.

3.2.4.2-Análise qualitativa

A partir das imagens transformadas foram calculadas a energia total, o momento da inércia total e 9 distribuições angulares de energia com 20 graus cada, totalizando 180 graus, relativos a metade de cada núcleo. O início da medida é feito a partir daquilo que se convencionou chamar de maior corda, que é a maior medida entre dois pontos do perímetro do núcleo.

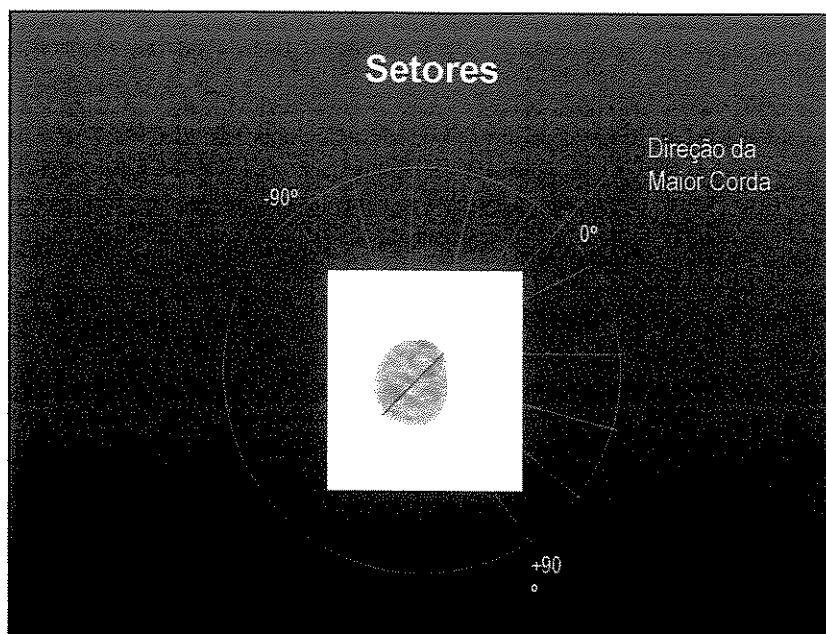


FIGURA 6-

3.3-APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-FCM-UNICAMP, protocolo nº077/2002 , fornecido em 19 de março de 2002.

4-RESULTADOS

A nossa amostra constou de 52 casos sem recidiva e 46 casos com recidiva. Os resultados obtidos foram os seguintes:

	Idade	Maior Å	Menor Å cm	Menor Marg	Med tu
Cases	98	98	98	98	98
Mean	64,8469	2,01327	1,29694	0,18091	1,42245
Std.deviation	10,9086	1,18996	0,74286	9,82432e-02	0,84518
Variation Coeff.	0,16822	0,59106	0,57278	0,54302	0,59417
Rel.V.Coeff.(%)	1,69928	5,97061	5,78597	5,48538	6,00208
Minimum	29,0000	0,40000	0,30000	5,00000e-02	0,30000
Maximum	84,0000	5,50000	3,50000	0,40000	4,00000
Range	55,0000	5,10000	3,20000	0,35000	3,70000
Median	65,0000	2,00000	1,00000	0,20000	1,20000

Como se trata de um processo (recidiva) que depende do tempo é obrigatório que se escolha um modelo matemático do tipo tempo/evento. Como todas as variáveis que foram analisadas podem ser demonstradas em números cardinais, utilizamos a regressão Cox.

No primeiro passo analisamos os parâmetros individualmente. Os parâmetros com valor $p < 0,1$ foram usados num segundo passo para calcular uma regressão Cox múltipla com procedimentos “passo-a-passo” para se obter o modelo que engloba os prognósticos independentes.

Testando as diferentes variáveis obtivemos os seguintes valores de p:

Sexo	= 0,549
Classif. Clark	0,308
Área exposta ao sol	0,372
Topografia esteticamente importante	0,652

Cefálico ou não cefálico	0,533
Tipohistológico	
Tipo=maior risco	0,001
Distância mínima da margem	0,003

Inércia dos setores seguintes:

-170a 10 graus	p=0,549
10 a 30 graus	0,572
30 a 50 graus	0,430
50 a 70 graus	0,206
70 a 90	0,230
90a110	0,101(=f)
110 a 130	0,127(=g)
130 a 150	0,334 (=h)
150 a170	0,507

A fim de obtermos um modelo preditivo parcimonioso nós incluímos na Regressão de Cox multivariada as seguintes variáveis: Menor distancia até a margem, tipo histológico, Inércia dos setores entre 50 e 130 graus. Usando o algoritmo condicional retrospectivo sem estratificação (com valores de p de 0,005 para entradas e de 0,1 para remoção)

(software SPSS – versão 10.0)

No modelo final as seguinte variáveis foram incluídas:

Tipo istológico ($B = -0,829$; $\exp B = 0,436$ (intervalo de confiança 0,229 to 0,834), $p = 0,012$;

Menor margem ($B = -3,243$ $\exp B = 0,039$ (0,001 to 1,131) $p = 0,059$)

Inércia do setor entre 70 e 90 graus

($B = 0,289$ $\exp B = 1,335$ (1,031 a 1,729) $p = 0,028$)

Inércia do setor entre 90 e 110 graus

($B = -0,331$; $\exp B = 0,719$ (0,555 a 0,930) $p = 0,012$;

Portanto o modelo final é:

LOG DA RAZÃO DE RISCOS = -0,83 x tipo histológico - 3,24 x menor
margem cirúrgica + 0,289xInércia setor 70 a 90 graus - 0,331 Inércia setor 90 a 100 graus.

5-DISCUSSÃO

Uma característica importante das imagens geradas pelo microscópio óptico é seu limite de resolução. Isto é, a luz não consegue descrever detalhes menores que seu comprimento de onda (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995). Em outras palavras, altas frequências espaciais cujo período espacial for menor que o dobro do limite da resolução não podem ser representadas, ou melhor, as altas frequências espaciais são filtradas. Assim, o microscópio óptico se comporta como um filtro passa-baixa. Isto é, deixa passar apenas as baixas frequências espaciais (RANDALL ADAM, dissertação de mestrado-Unicamp-DAP)

Isto significa uma vantagem para quem utilizar a análise de Fourier, porque pode-se ter a certeza de que não existem frequências espaciais tão altas que a câmara digitalizadora não possa capturar. Este fenômeno ocorre quando se utiliza grandes aumentos, geralmente entre 600 vezes a 1000 vezes, necessitando comumente de imersão a óleo. Uma consequência prática e interessante deste fenômeno é que se pode traçar na imagem transformada o limite de resolução como uma circunferência cujo centro coincide com o centro da mesma. O raio desta circunferência é inversamente proporcional ao dobro do limite de resolução da lente objetiva do microscópio utilizado.

A Transformada de Fourier discreta de uma imagem digital é considerada como uma aproximação da Transformada de Fourier contínua da imagem de onde a imagem digital foi obtida. Essa aproximação é sujeita a vários efeitos importantes causados pela natureza do processo de digitalização. A qualidade da aquisição depende do fabricante, e artefatos, tais como linhas horizontais, interferências e interpolações podem ocorrer. Mas mesmo assim, a transformada de Fourier discreta representa precisamente o espectro de uma imagem digital, independente da qualidade do processo de aquisição da imagem digital (JAMES, 1987)

Na literatura científica, podem ser encontrados trabalhos que utilizaram a transformada de Fourier para se estudar a forma de contornos nucleares, através da difração do laser em instrumentos ópticos, utilizando imagens microscópicas (KOOP, 1976) (GUERIN, 1986) (OSTROWSKI, 1983) (DZIEDZIC-GOCLAWSKA, 1982) (MILES & JAGAARD, 1980) (PERNICK, 1978) (WOHLERS, 1978)

(TUERKE, 1978). Apesar de produzir imagens transformadas instantaneamente, tais equipamentos apresentam desvantagens em relação aos computadores, porque nestes, as imagens digitais podem sofrer um pré-processamento,

filtrando descontinuidades e selecionando as texturas a serem estudadas. Poucos trabalhos empregaram a transformada de Fourier na análise de texturas de imagens digitais na anatomia patológica.

Um trabalho recente (CLARK, 2001) apresenta uma revisão de trabalhos que utilizaram a transformada de Fourier para analisar imagens de microscopia eletrônica do tecido conjuntivo da córnea e da esclera. Conseguiu-se demonstrar a diferença na organização ultra-estrutural, apesar de não utilizar técnicas para eliminar a descontinuidade provocada pelas bordas das imagens quadradas. Ao extrair características discriminantes sub-utiliza os dados fornecidos pela imagem transformada, empregando apenas o ponto de inflexão do perfil na escala logarítmica. Poderia utilizar muitos mais variáveis extraídas das imagens transformadas. Conclui que a especialização da ultra-estrutura do colágeno I altera a função do tecido conjuntivo, tornando-o transparente ou opaco, analisando a disposição e a espessura das fibras.

Banda-Ganboa, em 1993 relatou que um bom poder discriminante foi obtido analisando-se somente máscaras binárias dos núcleos da citologia esfoliativa do colo do útero. Melhores resultados foram alcançados quando se utilizou a textura nuclear. Este estudo poderia, com grande possibilidade, fornecer resultados mais satisfatórios se fossem filtradas as descontinuidades das bordas, eliminando a superposição da informação textural com os anéis de Airy. Selecionou quatro características texturais de Haralik, que foram as mais poderosas na discriminação das células: contraste, média, homogeneidade local e entropia. Neste trabalho o contraste e a homogeneidade local ficaram entre os que tiveram maior poder discriminante.

A orientação das fibras colágenas da derme lesional e não lesional de pacientes com esclerodermia foi comparada utilizando-se o conceito de orientação, discriminando com sucesso as imagens (VRIES, 2000). Foram comparados os resultados com os de outro método, com resultados superiores sobre o da refração do laser. Como crítica podemos citar que foram sub-utilizadas as informações fornecidas pelas imagens transformadas, aplicando uma limiarização, binarizando a imagem e estudando a forma da figura obtida. Poderiam ser usadas técnicas de detecção de anisotropia.

A transformada de Fourier de imagens histológicas de tumores malignos da próstata pode classificar corretamente 97,2% dos casos (SMITH, 1999). Foram segmentados os ácinos das glândulas prostáticas manualmente, mas as imagens binárias das glândulas apresentaram um poder discriminante menor, comparadas com as imagens originais. Não foi filtrada qualquer descontinuidade na imagem e isto pode causar distorções nos resultados. O intervalo de amostragem foi muito grande para a resolução empregada, mas mesmo assim se obteve bons resultados.

Em resumo tratam-se de poucos trabalhos usando a Transformada de Fourier. Pode-se atribuir esta falta de interesse ao fato de que o método possui um fundamento matemático pouco atraente, com uma teoria demasiadamente elaborada para ser entendido pela maioria dos profissionais da área da saúde. Alguns trabalhos sub-utilizaram as informações fornecidas pela imagem transformada, utilizando apenas poucos parâmetros ou realizando simplificações extremas, demonstrando pouco conhecimento sobre os princípios envolvidos. Nestes casos, o aprofundamento da análise poderia aumentar o poder discriminante.

Outros trabalhos se propuseram a investigar características texturais em modelos biológicos pouco adequados, onde o método apresenta pouco poder discriminante. Os modelos biológicos mais adequados para a análise de Fourier são aqueles que produzem imagens anisotrópicas, possuindo texturas com uma importante orientação direcional, como por exemplo, na imagem de um corte de um nervo ou de um músculo. Em segundo lugar, as texturas harmônicas, rítmicas, cujos elementos formadores possuem dimensões definidas, como fibras colágenas, parênquima hepático, ou corte transversal de nervo ou músculo. Em terceiro lugar estão os modelos onde tenta-se diferenciar duas texturas isotrópicas entre si. (RANDAL ADAM –dissertação de mestrado-Unicamp-DAP)

Neste último caso a composição das frequências espaciais pode discriminar texturas entre si.

Muito estudos que utilizaram a transformada de Fourier podem ser criticados pela resolução insuficiente na câmara de digitalização, gerando artefatos que dificultavam a discriminação entre os grupos de imagens. Nenhum trabalho utilizou técnicas de

pré-processamento visando a filtragem de discontinuidades e a seleção das áreas a serem estudadas. (RANDAL ADAM-dissertação de mestrado-Unicamp-DAP)

Em núcleos de células, a transformada de Fourier é composta pelo espectro da textura da cromatina e pelo efeito da discontinuidade das bordas nucleares. Ao se amaciar as bordas nucleares desaparecem os componentes de alta frequência que formavam a transição abrupta da luminância da borda nuclear. Na imagem transformada, estas altas frequências formam anéis concêntricos, que, em algumas direções são mais intensos, formando acentuações radiais. Esses anéis já foram descritos em estudos de refração por laser, chamados de anéis de Airy (BANDA-GANBOA, 1993) e são indesejáveis porque se superpõem ao espectro da cromatina nuclear, prejudicando o seu estudo numa análise discriminante.

Uma alternativa para eliminar as discontinuidades produzidas pelas bordas dos núcleos das células é diminuir ao máximo a mudança abrupta da luminância, aplicando um fundo com a luminância média do núcleo segmentado e amaciando com filtros de média as regiões próximas às bordas nucleares. Esse processo é chamado de pré-processamento da imagem, visto que se opera na imagem antes de ser transformada.

Como exemplo de pré-processamento existem a análise de distribuição da informação textural, o cálculo do perfil da imagem transformada e a extração de parâmetros estatísticos texturais da imagem transformada.(RANDAL ADAM –dissertação de mestrado-Unicamp-DAP)

A distribuição da informação textural na imagem transformada pode ser analisada sob a forma de espectro de Fourier, espectro de potência ou de momento de inércia. Em cada uma destas representações, pode ser comparado a distribuição da energia em cada direção e cada frequência.

No nosso trabalho estudamos a inércia de setores, cada qual com 20 graus de extensão, de núcleos de CBC que recidivaram ou não. Pudemos notar que, quando há uma grande diferença entre dois setores (para tanto subtraímos o resultado maior do menor) a chance de recidiva aumenta, ou seja, podemos através deste modelo mostrar que a heterogeneidade da textura da cromatina é característica de tumores mais agressivos, pois

estes apresentam esta cromatina mais irregular, devido possivelmente a alterações mais acentuadas no genoma com instabilidade genética (RESS J, 1994).

O estudo da genética molecular do CBC teve avanços com estudos sobre a síndrome do nevo basocelular (LEFFEL DJ, 1999). Em 1996, foi descrita uma anomalia do gen PTC, que estaria implicado em ambos os casos (CBC e síndrome) (GAILANI, 1997). Esse gen está localizado no braço longo do cromossomo 9 (9q22), seria um supressor tumoral importante. Quando ocorre a perda da heterozigocidade nesse locus ele se tornaria inativado. Poderia também sofrer alteração pela radiação ultra-violeta B, o que, em ambos os casos, levaria ao desenvolvimento de um CBC. (BALE AE, 2001).

A codificação da proteína p53 causada pela mutação do gen supressor tumoral é a anormalidade mais comumente descrita nos tumores humanos (LORAND-METZE, 1999). Outras alterações genéticas tem sido descritas como relacionadas a maior agressividade e poder de metastização do tumor, como descrito na trissomia do cromossomo 6. (MILROY CJ, 2000) (NANGIA R, 2001).

Um outro trabalho (HEENEN M, 1973) demonstrou grande quantidade de actinomicina tritiada nos núcleos de células de CBC quando comparadas com células de pele normal. Isto sugere que a cromatina nas células de CBC está num estado menos represado. Egan e Crocker em 1988 mostraram que células de CBC contem significativamente maior quantidade de regiões organizadoras de nucléolos contendo DNA ribossômico do que outros tipos de tumores cutâneos.

Um aumento no comprimento de telômeros (WAINWRIGHT LJ, 1995) foi descrito quando comparado com a medida média de telômeros de células da epiderme.

Estudos de imuno-histoquímica com o KI-67 (HORLOCK, 1997) demonstraram que existem diferenças entre índices de proliferação celular e velocidade de crescimento dependendo do tipo histológico. Outro trabalho mostrou que tumores infiltrativos apresentavam taxa de crescimento maior que os tumores nodulares. (HORLOCK, 1998). Outro estudo (REES J, 1994) coloca como evidente a participação do cromossomo 9 e de outros cromossomos no desenvolvimento de tumores basocelulares, mostrando que existem alterações genéticas que podem ser vistas através da textura de cromatina do núcleo do CBC.

Resumindo :

O nosso trabalho demonstra alterações da cromatina em CBCs mais agressivos, que podem ser utilizados como fator prognóstico independente e podem corresponder a alterações no genoma destas células.

6-CONCLUSÃO

O diagnóstico em anatomia patológica é muito dependente do patologista, e conseqüentemente do seu treinamento. Ele tem muitas limitações como a subjetividade, a reprodutibilidade e os limites de avaliação da lâmina pelo observador.

Por sua vez, a análise de texturas na anatomia patológica vem trazer novas possibilidade de refinar o diagnóstico, quando isso se faz necessário, pode prevenir erros diagnósticos quando, especialmente pequenas variações são responsáveis por grandes diferenças. Pode ainda auxiliar os serviços na obtenção de seu controle de qualidade.

Além dos fatores prognósticos conhecidos, como tipo histológico e distância da margem cirúrgica, há alterações sutis da cromatina de núcleos em lâminas de rotina, muito além da percepção do olho humano, indicando crescimento agressivo.

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

***7-REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- Adam, RL. Análise spectral usando a transformada de Fourier discreta para o estudo de núcleos celulares: elaboração de programa e aplicação no desenvolvimento do coração. Orientador: Konradin Metze e co-orientador: Neucimar Leite. Tese de mestrado. Unicamp – DAP – 2002.
- Bale AE, YU K. The hedgehog pathway and basal cell carcinoma. **Hum Mol Genet.** 10:757-62 2001
- Banda-Ganboa H. et al. Spectral Analysis of Cervical Cells using the discrete Fourier Transform. **Anal Cell Pathol** 5 (1993) 85-102.
- Canzonieri V, Monfardini S, Carbone A . Defining prognostic factors in malignancies through image analysis. **American Journal of Clinical pathology.** 1995. 103: 195-8.
- Clark JI. Fourier and Power law analysis of structural complexity in cornea and lens. **Micron** 32(3) 239-249 2001.
- Castleman KR. **Digital Image Analysis.** Englewood Cliffs, N.J. Prentice Hall, 1st edition, 1979
- Czarnecki D, Staples M, Mar A, et al. Recurrent nonmelanoma skin cancer in southern Australia. **Int J Dermatol** 1996;35:410-412
- De Rosa G, Ventrani A, Zeppa O, et al. Comparative morphometric analysis of aggressive and ordinary basal cell carcinoma of the skin. **Cancer** 65:544-549, 1990.
- De Rosa G, Staibano S, Barra E, et al. Nucleolar organizer regions in aggressive and noaggressive basal cell carcinoma of the skin. **Cancer** 69:123-126, 1992.
- De Silva SP, Dellon AL. Recurrence rate of positive margin basal cell carcinoma: results of a five year prospective study. **J Surg Oncol** 1985;28:72
- Dolan OM, Lowe L, Orringer MB et al. Basal cell carcinoma arising in a sternotomy scar: a report of three cases. **J Am Acad Dermatol.** 38: 491-493, 1998.
- Dixon AY, Lee SH, McGregor DH. Histologic features predictive of basal cell carcinoma recurrence: results of a multivariate analysis. **Cutan Pathol** 1993; 20: 137- 42.

- Dixon AY, Lee SH, McGregor PH. Factors predictive of recurrence of basal cell carcinoma. **Am J Dermatopathol** 1989;11:222-32
- Dublin N, Kopf AW. Multivariate risk score for recurrent cutaneous basal cell carcinomas. **Arch Dermatol.** 1983;119:393-397
- Dvorak H. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **N Engl J Med** 1986;315:1650-9
- Dziedzic-Goclawska A, Rozycka M, Czyba JC, Sawicki W, Moutier R, Lenczowski S, Ostrowski K. Application of optical Fourier transform for analysis of the spatial distribution of collagen fibers in normal and osteoporotic bone tissue. **Histochemistry.** 74:123-37 1982
- Egan MJ, Crocker J. Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. **J Pathol.** 154: 247-53 1988.
- Emmett AJJ. Surgical analysis and biological behaviour of 2277 basal cell carcinomas. **NZJ Surg** 1990;60:855
- Epstein E. Value of follow-up after treatment of basal cell carcinoma **Arch Dermatol** 1973;108:798-800
- Fleming ID, Amonette R, Monaghan T, Fleming MD. Principles of management of basal and squamous cell carcinoma of the skin. **Cancer** 1995; 75: 699-704.
- Gailani MR, Bale AE. Developmental genes and cancer: role of patched in basal cell carcinoma of the skin. **J Natl Cancer Inst.** 89: 1103-9 1997
- Gonzales RC, Wintz P. **Digital Image Processing.** 1987 – 2nd ed. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts.
- Gooding CA, White G, Yatsushashi M. Medical intelligence: significance of marginal extension in excised basal-cell carcinoma. **N. Engl J Med** 1965; 17: 923-924
- Guerin JF, Rozycka M, Dziedzic-Goclawska A, Ostrowski K, Rafat A, Leszczynski K. Objective evaluation of fibrosis in human testicular biopsies by analysis based on optical diffractometry. **Acta Anatomica.** 125:88-92 1986

- Grimwood RE, Ferris CF, Mercill DB, Huff JC. Proliferating cells of human basal cell carcinoma are located on the periphery of tumor nodules. **J Invest Dermatol** 1986;86:191-4
- Hall PA, Levison DA. Assessment of cell proliferation in histological material (Review). **J Clin Pathol** 1990; 43:184-92
- Haralick RM. Textural features for image classification. **IEE Transactions on systems, man and cybernetics**. 1973. 3:610-21.
- Hauben DJ, Zirkin H, Mahler D, et al. The biologic behavior of basal cell carcinoma: analysis of recurrence in excised basal cell carcinoma. Part II. **Plast Reconstr Surg** 1982;69:110-116
- Heenen M, Preumont AM, Galand P. Nuclear binding of tritiated actinomycin in basal cell carcinomas and in normal human epidermis. **Cancer Res**. 33:2624-6 1973
- Horlock NM, Wilson GD, Daley FM, Richman PI, Sanders R. Cellular proliferation characteristics of basal cell carcinoma: relationship to clinical and histopathology. **Eur J Surg Oncol**. 23 (3):247-52 1997
- Horlock NM, Wilson GD, Daley FM, Richman PI, Sanders R, Grobbelaar, R. Foy C. Cellular proliferation characteristics do not account for behaviour of horrifying basal cell carcinoma. A comparison of the growth fraction of horrifying and non horrifying tumours. **Br J Plast Surg**. 51: 59-66 1998
- Jacobs GH, Rippey JJ, Altini M: Prediction of aggressive behavior in basal cell carcinoma. **Cancer** 1982;49:533-537
- Jahoda CAB, Reynolds AJ, Chaponnier C, Forester JC, Gabbiani G. Smooth muscle alpha-actin is a marker for hair follicle dermis in vivo and in vitro. **J Cell Sci** 1991;99:627-36
- James M. **Pattern Recognition**. BSP Professional Books, Oxford, 1st edition 1987
- Junqueira LC & Carneiro J. **Histologia Básica**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 4 edição 1995.

- Karagas MR, Stukel AS, Greenberg ER, et al. Risk of subsequent basal cell and squamous cell carcinoma of the skin among patients with prior skin cancer. **JAMA** 1992;267:3305-3310
- Koop R, Lisa J, Mendelsohn J, Pernick B, Sotone H, Wohlers R. Coherent optical processing of cervical cytologic samples. **J Histochem Cytochem.** 24(1):122-37 1976
- Kuo HR, Lapidus A, Lambert WC. Identification of early apoptosis in feulgen stained cultured cells in situ by computerized image analysis. **Cytometry** . 33:420-7 1988.
- Lang PG, Maize JC: Histologic evolution of recurrent basal cell carcinoma and treatment implications. **J Am Acad Dermatol** 1986;14:186-196
- Leffel DJ, Fitzgerald DA. Basal Cell Carcinoma, in: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 5th edition, New York; MacGraw –Hill. 857-64 1999.
- Lorand- Metze I., Meira D.G., Lima C. S. P., Vassallo J., Metze K., The differential diagnosis between aplastic anemia and hypocellular myelodysplasia in patients with pancytopenia. **Journal of Hematology** 84:562-563 (1999)
- Marchevsky AM, Bartels PH. **Image Analysis: A Primer for Pathologists.** Raven Press, New York. 1st edition 1994
- Marghoob A Kopf AW, Bart RS, Sanfilippo L, Silverman MK, Lee P, Levy E, Vossaert KA, Yadav S, Abadir M: Risk of another basal cell carcinoma developing after treatment of a basal cell carcinoma. **J Am Acad Dermatol** 1993;28:22-28
- Metze K., Lobo A N., Lorand-Metze I., Nucleolus organizer regions (agnors) and total tumor mass are independent prognostic parameters for treatment-free period in chronic lymphocytic leukemia. **Int. J Cancer Ped Oncol:** 89, 4410-443 (2000)
- Metze K & Lorand-Metze. Agnor staining in normal bone marrow cells (letter). **Journal of Clinical Pathology** 1991: 44:526.
- Metze K & Lorand-Metze. Silver staining of nucleolar organizing regions in prostatic lesions (letter). **Histopathology:** 21:97-8 1992
- Metze K & Lorand-Metze. Interpretation of the Agnor pattern in haematologic cytology. **Ata Haematologica.** 89(2):110-1. 1993

- Metze K & Lorand-Metze. Age related decrease of Agnor activity in acute and cronic lymphocytic leukemia. **Journal of Clinical Pathology: molecular pathology.** 52:52.1999.
- Metze K, Trevisan M. The use of epithelial membrane antigen and silver stained nucleolar organizer regions testing in the differential of mesothelioma form benign reactive mesothelioses. **Cancer.** 85: 250. 1999
- Miles CP, Jaggard DL. The use of optical Fourier transform to diagnosing pleomorphism, size and chromatin cumpling in nuclear models. **Analytical and Quantitative Cytology.** 3(2):149-56. 1981.
- Miller SJ. Biology of basal cell carcinoma (part 1). *J Am Acad Dermatol* 1991;24:1-13
Miller SJ. Biology of basal cell carcinoma (part 1). **J Am Acad Dermatol** 1991;24:1-13
- Milroy CJ, Horlock N, Wilson GD, Sanders R. Aggressive basal cell carcinoma in young patients: fact or fiction? *Br J Plast Surg.* 4:232-239 2000
- Morris JA. Information and observer disagreement in hisopathology. **Histopathology.** 1994. 25:123-8
- Nangia R, Sait SNJ, Block A, et al. Trisomy 6 in basal cell carcinomas correlates with metastatic potential. A dual color fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections. **Cancer.** 91:1927-32 2001
- Ostrowski K, Thyberg J, Dziedzic-Cioclawska A, Ksiazek T, Nilsson J, Palmberg L, Sjolund M. Application of optical diffractometry in studies of cell fine structure. **Histochemistry.** 78:435-49 1983
- Pernick B, Koop RE, Lisa J, Mendelsohn J, Stone H, Wohlers R. Screening of cervical samples using coherent optical processing. **Applied Optics.** 17:21-34 1978
- Press WH, Teutowsky SA, Vetterling WT, Flannery B. **Numerical recipes in C: The Art of Scientific Computing.** Cambridge University Press, New York, 2nd edition 1992
- Pressman NJ. Markovian analysis of cervical cells image. **Journal of Hystochemistry and Cytochemistry.** 24:138-44. 1976
- Rees J. Genetic alterations in non-melanoma skin cancer. **J Invest Dermatol.** 103(6) 747-50 1994

- Richmond JD, Davie RM. The significance of incomplete excision in patients with basal cell carcinoma. **Brit J Plast Surg** 1987;40:63
- Robinson JK: Risk of developing another basal cell carcinoma: A 5-year prospective study. **Cancer** 1987;60:118-120
- Rowe DE, Carroll RJ, Day CL. Long term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma; implications for patient follow-up. **J Dermatol Surg Oncol** 1989;15:315-328
- Rozycka M, Sawicki W, Traczyk Z, Bem W, Strojny P. Analysis in chromatin pattern in blood lymphocytes of healthy donors and in lymphoid cells of patients with chronic lymphocytic leukaemia. **Journal of Clinical Pathology**. 41(5):504-9.1988
- Sexton M, Jones DB, Maloney ME. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma: study of a series of 1039 consecutive neoplasms. **J Am Acad Dermatol** 1990;23:1118-1126
- Silverman MK, Kopf AW, Bart RS, Grin CM, Levenstein MS: Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. 3. Surgical excision. **J Dermatol Surg Oncol** 1992;18:471-476
- Smith et al. Similarity measurement method for the classification of architecturally different images., **Comp Biomed Res** 32 (1999) 1-12.
- Spina D, Disanto A, Luzi P, Tosi P, Gallorini M, Mouthon A, Kraft R, Cottier H. Novel contrast gradient oriented, automated chromatin texture analysis. **Virchows Archives B-Cellular Pathology**. 62:119-124.1992
- Stephenson TJ. Image analysis. **Journal of Pathology**. 1992. 166(1) 83-7.
- Taylor GA, Barisoni D. Ten years' experience in the surgical treatment of basal-cell carcinoma: a study of factors associated with recurrence. **Br J Surg** 1973; 60:522-525
- Thunnissen FBJM, Diegenbach PC. Classification of lung carcinoma by means of digital nuclear image analysis. **Analytical quantitative cytology and histology**. 1986. 8:301-4.

- Tuerke B, Seger G, Achatz M, Seelen WV. Fourier optical approach to the extraction of morphological parameters from the diffraction pattern of biological cells. **Applied Optics**. 17:2754-5-61 1978
- True LD. Morphometric applications in anatomic pathology. **Human Pathology**. 1996. 27 (5)450-67
- Van Gool F, Dewaele P, Oosterlinck A . Survey: Texture analysis anno 1983. **Computer vision, graphics and image processing**. 1985. 29: 336-57.
- Vries HJCD, Enomoto DHN, Mrle JV, Zuijlen PPMV, Mekkes JR, Bos JD. Dermal organization in scleroderma. The FFT and the kaser scatter method objectify fibrosis in nonlesional as well as lesional skin. **Laboratory Investigation**.80:1281-9 2000.
- Wainwright LJ, Middleton PG, Rees JL. Changes in mean telomere length in basal cell carcinomas of skin. **Genes Chromosomes Cancer**. 12(1):45-9 1995
- Weinstein GD, Frost P. Cell proliferation in human basal cell carcinoma. **Cancer Res** 1970;30:727-8
- Wilder RB, Shimm DS, Kittelson JM, Rogoff EE, Cassady JR. Recurrent basal cell carcinoma treated with radiation therapy. **Arch Dermatol** 1991;127:1668-72
- Wohlers R, Mendelsohn J, Koop RE, Pernick BJ. Screening of cervical cytological samples using coherent optical processing. Part 2. **Applied Optics**. 17:35-42 1978
- Wouwer GVD, Weyn B, Scheunders P, Jacob W, Marck EV, Dyck, DV. Wavelets as chromatin texture descriptors for the automated identification of neoplastic nuclei. **Journal of Microscopy**. 197:25-35, 2000.

8-ANEXOS

# HC	Biopsia	Lamina	Iniciais	Nascto	Idade	Cor	Sex	T obs (m)	Data 1ª Retirada	Mayor A cm	Menor A cm	Menor Marg tu	Med tu	Clark	Nivel agr	Sol N	Est N	CefN	T apar (m)	Rec	Class.	Clas 2
#313593-3	B57117/91	1D	JRM	10/03/53	38	1	1	45	29/05/91	1	0,5	0,1	0,8	2	2	1	1	1	12	1	B	5
#313593-3	B57117/91	1C	JRM	10/03/53	38	1	1	47	29/05/91	0,7	0,5	0,05	0,6	1	1	1	1	1	12	1	B	5
#313593-3	B57117/91	MIE	JRM	10/03/53	38	1	1	40	29/05/91	1,3	1	0,05	1,2	2	2	1	1	0	7	1	B	5
#347226-4	B69132/92	3	JCF	10/04/34	58	1	1	60	28/03/92	0,5	0,3	0,05	0,4	2	2	1	1	1	120	1	B	3
#398082-3	B08446/93	1	ATO	04/10/43	50	1	2	24	05/08/93	1,5	1	0,1	1,2	2	2	1	1	1	48	1	M	2
#365597-3	B09230/93	1	OCM	22/05/29	64	1	2	30	03/09/93	2,5	1,5	0,2	2	2	2	1	1	1	24	1	M	1
#365597-3	B09230/93	2/C	OCM	22/05/29	64	1	2	30	03/09/93	1,5	1	0,1	1,2	2	2	1	2	1	24	1	M	1
#407076-4	B09791/93	1	AAAM	30/08/12	81	1	2	24	30/09/93	0,8	0,5	0,05	0,7	2	1	1	1	1	12	1	M	1
#414060-2	B10469/93	1 (II)	AG	12/10/31	62	1	1	24	04/10/93	2	1	0,3	1,2	1	2	1	1	1	24	1	M	3
#414060-2	B10469/93	3/C	AG	12/10/31	62	1	1	24	04/10/93	2,5	1,5	0,25	1,8	1	1	1	1	1	12	1	B	1
#322726-3	B03526/94	1	OJPJ	02/07/65	29	1	1	48	04/04/94	0,5	0,5	0,05	0,4	1	1	1	1	1	12	1	M	1
#322726-3	B03526/94	2F	OJPJ	02/07/65	29	1	1	49	04/04/94	0,4	0,4	0,05	0,3	2	2	1	1	1	12	1	B	1
#368023-3	B04636/94	S/nº	AS	20/04/37	57	1	1	2	23/05/94	1,5	1	0,2	1	2	2	1	1	1	48	1	B	2
#411133-4	B06051/94	S/nº	PDMC	04/02/39	55	1	2	50	01/07/94	0,4	0,3	0,05	0,3	2	2	1	1	1	12	1	B	1
#326573-2	B08041-94	A	DPK	08/08/26	68	1	1	60	18/08/94	1,5	1	0,1	1,2	1	2	1	2	1	6	1	M	3
#470161-2	B01734/95	2	JC	15/08/17	78	1	1	28	06/02/95	2	1	0,2	1,4	2	2	1	1	1	6	1	M	3
#466268-2	B03114/95	1	FPM	05/08/23	72	1	2	36	11/04/95	1	0,7	0,05	0,8	1	1	1	1	1	12	1	B	1
#497119-4	B05303/95	1	CT	01/02/34	61	1	1	24	15/05/95	1,1	0,7	0,05	1	1	1	1	1	1	12	1	B	2
#482242-4	B06415/95	A	JP	28/12/29	66	1	1	12	14/05/95	4	2	0,3	3,2	1	1	2	2	0	24	1	B	1
#398062-3	B08303/95	1	ATO	04/10/43	50	1	2	24	05/08/93	1,5	1	0,2	1	1	1	1	1	1	40	1	B	1
#414060-2	B10256/95	1	AG	12/10/31	64	1	1	24	04/10/95	2	1	0,2	1,4	1	2	1	1	1	60	1	M	3
#512679-4	B12076/95	S/nº	MRF	08/08/26	69	1	2	43	27/11/95	4,5	2	0,4	3,2	2	2	1	1	1	12	1	B	1
#362598-3	B00245/96	1	APM	28/08/25	71	1	2	24	12/01/96	1,5	1	0,2	1,2	2	1	1	1	1	24	1	B	2
#494497-3	B01021/96	1	JAS	14/06/38	58	1	1	36	07/02/96	1	0,6	0,1	0,8	1	1	1	1	1	24	1	M	1
#	B01459/96	S/nº	FAA	01/03/26	70	1	1	36	03/04/99	2,5	2	0,2	2	2	2	1	1	1	12	1	M	2
#450814-3	B01550/96	S/nº	AVC	07/06/37	59	1	1	12	10/08/96	1	0,6	0,1	0,8	2	2	1	1	1	24	1	M	3
#482242-4	B03130/96	1	JP	28/12/29	66	1	1	10	14/06/95	4	2	0,3	3,2	1	1	2	2	0	24	1	B	5
#544688-3	B04525/96	4A	PFP	21/09/18	78	1	2	6	02/05/96	2	1,5	0,1	1,8	2	2	1	1	1	6	1	B	1
#544688-3	B04525/96	4B/C	PFP	21/09/18	78	1	2	6	02/05/96	0,5	0,3	0,05	0,4	2	2	1	1	1	6	1	B	1
#493387-5	B10983/96	1	VG	10/01/34	62	2	1	9	02/02/96	2	1	0,25	1,4	1	1	1	1	1	20	1	B	2
#562708-1	B11455/96	S/nº	IM	02/05/43	53	1	2	60	31/10/96	2,8	2	0,3	2,2	2	2	1	1	1	12	1	M	3

# HC	Biopsia	Lamina	Iniciais	Nascto	Idade	Cor	Sex	T obs (m)	Data 1ª Retrada	Maior A cm	Menor A cm	Menor Marg tu	Med tu	Clark	Nivel agr	Sol N	Est N	CeN	Tapar (m)	Rec	Class.	Clas 2
#549907-2	B12380/96	S/nº	SN	22/02/29	67	2	1	3	28/11/96	1	0,5	0,1	0,6	2	2	1	1	1	12	1	B	1
#497119-4	B01365/97	A D T	CT	01/02/34	62	1	1	12	22/02/96	1	0,7	0,1	0,8	1	2	1	1	1	12	1	M	2
#549907-7	B01368/97	2B	SN	22/02/29	68	2	1	4	26/02/97	2	0,8	0,3	1	1	1	1	1	1	13	1	B	1
#549907-7	B01368/97	2A / L/C	SN	22/02/29	68	2	1	4	26/02/97	1	0,5	0,1	0,6	2	2	1	1	1	13	1	B	1
#520720-3	B03939/97	3	ERM	29/03/33	64	1	2	12	03/06/97	3	2	0,3	2,4	1	1	1	1	1	12	1	B	1
#497119-4	B05763/97	A B(mr)	CT	01/02/34	61	1	1	36	22/05/97	1,5	0,7	0,2	1,2	1	2	1	2	0	12	1	M	3
#597966-4	B05764/97	B	LOF	24/09/47	50	1	2	8	18/06/97	0,4	0,3	0,05	0,3	1	1	1	2	1	72	1	B	5
#485718-4	B12358/97	S/nº	AAK	14/12/40	58	1	1	18	25/06/98	1,5	1	0,1	1,2	2	2	1	1	1	12	1	M	2
#326573-2	B08238/98	1	DPK	08/08/26	68	1	1	79	18/08/94	1,5	1	0,1	1,2	1	2	1	1	1	8	1	B	2
#411133-4	B09092/98	1	PDMC	04/02/29	65	1	2	50	01/07/94	0,4	0,3	0,05	0,3	1	1	1	1	1	20	1	B	1
#579917-1	B00412/99	S/nº	SP	16/07/32	67	1	1	5	13/01/99	0,4	0,3	0,05	0,3	2	2	2	2	1	6	1	B	5
#326573-2	B02604/99	22F	DPK	08/08/26	68	1	1	55	18/08/94	1,5	1	0,2	1	1	1	1	2	1	6	1	B	2
#326573-2	B02604/99	24T / F/C	DPK	08/08/26	68	1	1	55	18/08/94	2,5	1	0,2	1,8	1	2	1	2	1	6	1	M	2
#457614-2	B03490/99	1T/B/I	OS	18/01/26	69	1	1	47	14/05/95	0,6	0,3	0,08	0,5	2	2	2	2	0	24	1	M	3
#457614-2	B03490/99	2A / L	OS	18/01/26	69	1	1	47	14/05/95	0,7	0,5	0,05	0,5	2	2	2	2	0	24	1	M	3

# HC	Biopsia	Lamina	Iniciais	Nascto	Idade	Cor	Sex	T obs (m)	Data 1ª Retrada	Maior A cm	Menor A cm	Menor Marg tu	Med tu	Clark	Nivel agr	Sol N	Est N	CefN	T apar (m)	Rec	Class.	Clas 2
#481232-2	B0472692	B04	MR	02/07/27	68	1	2	72	09/03/95	1,5	1,5	0,1	1,2	1	2	2	2	1	12	0	B	1
#347226-4	B0913292	4	JCF	10/04/34	62	1	1	60	21/07/96	2	1,5	0,2	1,3	2	2	1	1	1	100	0	B	3
#347226-4	B0913292	2B	JCF	10/04/34	62	1	1	60	21/07/96	2	1,5	0,2	1,3	2	2	1	1	1	100	0	M	3
#414060-2	B1046993	2/D	AG	12/10/31	62	1	1	24	04/10/93	2,5	1,5	0,25	2	1	2	1	1	1	36	0	M	3
#414060-2	B1046993	4/E	AG	12/10/31	62	1	1	24	04/10/93	3	2	0,2	2	1	2	1	1	1	12	0	M	2
#436918-3	B0562794	E	LAJ	18/07/26	68	1	2	73	01/06/94	2,5	1,5	0,25	1,6	1	2	1	1	1	12	0	M	3
#470161-2	B01734/95	3/C	JC	15/08/17	78	1	1	27	06/02/95	2,5	1,5	0,3	1,8	2	2	1	1	1	6	0	M	2
#470161-2	B01734/95	4/D	JC	15/08/17	78	1	1	27	06/02/95	1,5	1,0	0,15	1,2	2	2	1	1	1	6	0	M	2
#470161-2	B01734/95	5/E	JC	15/08/17	78	1	1	27	06/02/95	1,5	1,5	0,1	1,1	2	2	1	1	1	6	0	M	3
#470161-2	B01734/95	7/F	JC	15/08/17	78	1	1	27	06/02/95	1	1	0,1	0,7	2	2	1	1	1	6	0	M	3
#478980-2	B02386/95	4	CCP	09/10/34	61	1	2	72	24/02/95	5	2	0,3	4	2	1	2	2	0	12	0	B	5
#481185-3	B04931/95	B	CSS	11/06/21	74	3	2	59	14/05/95	2	1	0,3	1,3	2	2	1	1	1	3	0	M	3
#497119-4	B05303/95	2/C	CT	01/02/34	61	1	1	62	15/05/95	0,6	0,5	0,05	0,5	1	1	1	1	1	12	0	B	1
#385470-5	B05660/95	1	APSS	31/08/17	78	1	1	60	28/03/95	2	1,5	0,3	1,4	2	2	1	1	1	24	0	B	3
#476267-4	B06137/95	P/2B	NPD	06/04/36	59	1	2	69	20/06/95	2,5	1,8	0,3	1,8	2	2	1	1	1	36	0	M	3
#497647-1	B06671/95	11	NK	27/08/27	68	1	1	68	24/06/95	5,5	2,5	0,4	3,5	2	2	1	2	1	24	0	M	2
#49767-1	B07274/95	1P/B	A F	07/12/11	84	1	2	68	12/07/95	2	1,5	0,2	1,5	2	1	1	1	1	24	0	M	3
#492795-5	B03546/95	1	MCNP	08/04/46	49	1	2	68	20/09/95	2	1,5	0,25	1,4	2	2	1	1	1	12	0	M	1
#511897-1	B09616/95	F/P	JAC	29/01/37	58	1	1	66	19/09/95	3,5	3	0,3	2,5	2	2	1	1	1	5	0	M	3
#497119-4	B10093/95	3	CT	01/02/34	61	1	1	54	29/09/95	1,5	1	0,2	1,1	1	2	1	2	0	12	0	M	3
#497119-4	B10093/95	4/C	CT	01/02/34	61	1	1	54	29/09/95	2,5	0,9	0,2	1,8	1	2	1	2	0	12	0	M	3
#414060-2	B10256/95	2/C	AG	12/10/31	64	1	1	24	04/10/95	1,5	1	0,1	0,9	1	2	1	1	1	60	0	B	3
#492019-0	B10361/95	B/F	UCC	27/07/17	78	1	2	67	27/07/95	2,5	2,5	0,2	1,7	2	2	1	1	1	5	0	M	3
#507314-3	B11853/95	1	JBS	28/10/34	61	1	2	64	20/11/95	1	1	0,1	0,7	1	1	1	1	1	24	0	M	1
#481836-4	B11894/95	1	CSP	26/08/41	54	1	2	64	01/12/95	3	2	0,2	2,5	1	1	2	2	0	24	0	B	1
#480288-4	B12833/95	1	JQ	26/08/21	74	1	1	58	30/01/95	2	1,3	0,2	1,3	1	1	1	1	1	132	0	M	1
#480288-4	B12833/95	3/C	JQ	26/08/21	74	1	1	58	30/01/95	4,5	1,5	0,2	3,3	1	1	2	2	1	132	0	M	1
#523796-3	B00177/96	A/F	JB	09/10/15	81	1	1	63	05/01/96	5	2,5	0,3	3,5	2	2	2	2	0	12	0	M	2
#324604-3	B02172/96	T	VL	29/07/26	70	1	1	57	12/06/96	2	1,7	0,3	1,2	1	2	1	1	1	12	0	M	1
#497119-4	B03480/96	5	CT	01/02/34	62	1	1	62	18/01/96	1,5	0,9	0,2	1	1	1	1	1	1	12	0	B	2

# HC	Biopsia	Lamina	Iniciais	Nascto	Idade	Cor	T obs (m)	Data 1ª Retirada	Mayor A cm	Menor A cm	Menor Marg tu	Med tu	Clark	Nivel agr	Sol N	Est N	CafN	T apar (m)	Rec	Class.	Clas 2
#480288-4	B03923/96	1	JQ	26/08/21	75	1	58	20/04/96	2,5	2	0,3	1,7	2	2	2	2	0	12	0	M	3
#480288-4	B03923/96	2A / B/C	JQ	26/08/21	75	1	58	20/04/96	3,5	3	0,4	2,5	2	2	2	2	0	10	0	M	3
#336005-3	B04199/96	1	JD	05/06/14	82	1	57	09/07/96	5,5	3,5	0,3	4	2	2	1	1	1	24	0	M	1
#539170-3	B05797/96	1	RMS	15/08/16	80	1	57	13/06/96	1,3	1	0,2	0,8	2	2	1	1	1	12	0	M	1
#526845-4	B06418/96	A B	AP	12/11/34	62	1	59	20/06/96	2,5	2	0,3	1,5	2	1	2	2	0	72	0	B	1
#498152-3	B06538/96	2	LS	29/12/18	78	1	57	04/06/96	1,5	0,7	0,2	1	1	1			1	7	0	B	1
#498152-3	B06538/96	3/C	LS	29/12/18	78	1	57	04/06/96	1,5	1,5	0,1	1,1	2	2	1	1	1	12	0	M	1
#498152-3	B06538/96	4/D	LS	29/12/18	78	1	57	04/06/96	1,5	1,5	0,1	1,3	2	2	1	2	1	9	0	M	3
#365280-2	B06606/96	1	RMN	21/03/40	56	1	57	25/06/96	2	1,5	0,2	1,6	2	2	1	1	1	6	0	M	1
#505142-4	B06801/96	1	MAT	04/03/42	54	1	56	01/07/96	2	1,5	0,2	1,5	2	2	1	1	1	24	0	M	2
#343886-2	B07463/96	2	SZM	10/10/39	57	1	55	20/07/96	1,5	1,5	0,1	1,1	2	1	2	2	0	48	0	B	1
#343886-2	B07463/96	4/C	SZM	10/10/39	57	1	55	20/07/96	1	0,5	0,1	0,8	1	2	1	1	1	48	0	B	3
#500956-1	B07466/96	F / A / B	CG	09/09/30	66	1	56	18/07/96	2,5	2	0,25	2	2	2	1	1	1	60	0	M	3
#546691-0	B08388/96	1P / B	AG V	18/05/33	63	1	55	12/08/96	2	1,5	0,3	1,2	2	2	1	1	1	12	0	M	3
#546691-0	B08388/96	2/C	AG V	18/05/33	63	1	55	12/08/96	3	3	0,2	2,2	1	1	1	1	1	12	0	M	3
#546279-2	B08567/96	B / T	JVP	30/09/18	78	1	55	15/08/96	4,5	3,5	0,4	3,2	2	2	1	1	1	6	0	M	3
#544210-2	B09117/96	x	MMPP	21/06/16	80	1	55	29/08/96	1,2	1	0,1	1	2	1	1	1	1	6	0	B	2
#551019-3	B10186/96	3	JLS	28/09/29	67	2	54	26/09/96	1,5	0,7	0,1	1,3	2	2	1	1	1	120	0	M	2
#551019-3	B10186/96	4/C	JLS	28/09/29	67	2	54	26/09/96	2	1,5	0,3	1,4	2	2	1	1	1	120	0	M	3
#540783-1	B10797/96	B / C	MSO	11/02/31	65	1	52	15/10/96	0,5	0,3	0,05	0,4	2	2	1	1	1	18	0	M	1
#560587-1	B12194/96	B C T	VF	23/06/38	58	3	52	25/11/96	2,5	2	0,2	2	2	2	1	1	1	24	0	M	2
#326573-2	B03502/98	T	DPK	08/08/26	68	1	52	18/08/94	1,5	1	0,2	0,9	1	1	1	1	1	8	0	B	5

1-Adenóide
2- Clístico
-Esclerosante
4-Multifocal
5-Superficial

# HC	Biopsia	Lamina	Iniciais	Nascto	Idade	Cor	Sex	T obs (m)	Data 1ª Retirada	Maior A cm	Menor A cm	Menor Marg tu	Med tu	Clark	Nivel agr	Sol N	Est N	CofN	T apar (m)	Rec	Class.	Clas 2
#313593-3	B57117/91	1D	JRM	10/03/53	38	1	1	45	29/05/91	1	0,5	0,1	0,8	2	2	1	1	1	12	1	B	5
#313593-3	B57117/91	1C	JRM	10/03/53	38	1	1	47	29/05/91	0,7	0,5	0,05	0,6	1	1	1	1	1	12	1	B	5
#313593-3	B57117/91	MIE	JRM	10/03/53	38	1	1	40	29/05/91	1,3	1	0,05	1,2	2	2	1	1	0	7	1	B	5
#347226-4	B69132/92	3	JCF	10/04/34	58	1	1	60	26/03/92	0,5	0,3	0,05	0,4	2	2	1	1	1	120	1	B	3
#398062-3	B06446/93	1	ATO	04/10/43	50	1	2	24	05/08/93	1,5	1	0,1	1,2	2	2	1	1	1	48	1	M	2
#395597-3	B09230/93	1	OCM	22/05/29	64	1	2	30	03/09/93	2,5	1,5	0,2	2	2	2	1	1	1	24	1	M	1
#395597-3	B09230/93	2/C	OCM	22/05/29	64	1	2	30	03/09/93	1,5	1	0,1	1,2	2	2	1	2	1	24	1	M	1
#407076-4	B09791/93	1	AAAM	30/08/12	81	1	2	24	30/09/93	0,8	0,5	0,05	0,7	2	1	1	1	1	12	1	M	1
#414060-2	B10469/93	1 (H)	AG	12/10/31	62	1	1	24	04/10/93	2	1	0,3	1,2	1	2	1	1	1	24	1	M	3
#414060-2	B10469/93	3/C	AG	12/10/31	62	1	1	24	04/10/93	2,5	1,5	0,25	1,8	1	1	1	1	1	12	1	B	1
#322726-3	B03526/94	1	QJPJ	02/07/65	29	1	1	48	04/04/94	0,5	0,5	0,05	0,4	1	1	1	1	1	12	1	M	1
#322726-3	B03526/94	2F	QJPJ	02/07/65	29	1	1	49	04/04/94	0,4	0,4	0,05	0,3	2	2	1	1	1	12	1	B	1
#388023-3	B04636/94	SI nº	AS	20/04/37	57	1	1	2	23/05/94	1,5	1	0,2	1	2	2	1	1	1	48	1	B	2
#411133-4	B06067/94	SI nº	PDMC	04/02/39	55	1	2	50	01/07/94	0,4	0,3	0,05	0,3	2	2	1	1	1	12	1	B	1
#326573-2	B08041-94	A	DPK	08/08/26	68	1	1	60	18/08/94	1,5	1	0,1	1,2	1	2	1	2	1	6	1	M	3
#470161-2	B01734/95	2	JC	15/08/17	78	1	1	28	06/02/95	2	1	0,2	1,4	2	2	1	1	1	6	1	M	3
#456268-2	B03114/95	1	FPM	05/08/23	72	1	2	36	11/04/95	1	0,7	0,05	0,8	1	1	1	1	1	12	1	B	1
#497119-4	B05303/95	1	CT	01/02/34	61	1	1	24	15/05/95	1,1	0,7	0,05	1	1	1	1	1	1	12	1	B	2
#482424-4	B06415/95	A	JP	28/12/29	66	1	1	12	14/06/95	4	2	0,3	3,2	1	1	2	2	0	24	1	B	1
#398062-3	B08303/95	1	ATO	04/10/43	50	1	2	24	05/08/93	1,5	1	0,2	1	1	1	1	1	1	40	1	B	1
#414060-2	B10256/95	1	AG	12/10/31	64	1	1	24	04/10/95	2	1	0,2	1,4	1	2	1	1	1	60	1	M	3
#512679-4	B12076/95	SI nº	MRF	08/08/26	69	1	2	43	27/11/95	4,5	2	0,4	3,2	2	2	1	1	1	12	1	B	1
#362598-3	B00245/96	1	APM	28/08/25	71	1	2	24	12/01/96	1,5	1	0,2	1,2	2	1	1	1	1	24	1	B	2
#494497-3	B01021/96	1	JAS	14/08/38	58	1	1	36	07/02/96	1	0,6	0,1	0,8	1	1	1	1	1	24	1	M	1
#	B01459/96	SI nº	FAA	01/03/26	70	1	1	36	03/04/1996	2,5	2	0,2	2	2	2	1	1	1	12	1	M	2
#450814-3	B01550/96	SI nº	AVC	07/06/37	59	1	1	12	10/08/96	1	0,6	0,1	0,8	2	2	1	1	1	24	1	M	3
#482424-4	B03130/96	1	JP	28/12/29	66	1	1	10	14/06/95	4	2	0,3	3,2	1	1	2	2	0	24	1	B	5
#644688-3	B04525/96	4A	PFP	21/09/18	78	1	2	6	02/05/96	2	1,5	0,1	1,8	2	2	1	1	1	6	1	B	1
#644688-3	B04525/96	4B/C	PFP	21/09/18	78	1	2	6	02/05/96	0,5	0,3	0,05	0,4	2	2	1	1	1	6	1	B	1
#493387-5	B10983/96	1	VG	10/01/34	62	2	1	9	02/02/96	2	1	0,25	1,4	1	1	1	1	1	20	1	B	2
#662708-1	B11455/96	SI nº	IM	02/05/43	53	1	2	60	31/10/96	2,8	2	0,3	2,2	2	2	1	1	1	12	1	M	3