
Gislaine Vieira

**Análise da Arquitetura da Aorta de Pacientes
Hipertensos e Normotensos**

UNICAMP

Campinas, 2009.

Gislaine Veira

Análise da Arquitetura da Aorta de Pacientes Hipertensos e Normotensos.

Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

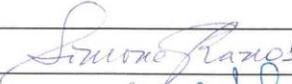
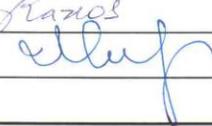
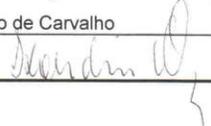
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar

Unicamp,
Campinas, 2009.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Gislaine Vieira

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

Membros:

-
1. Prof. Dr. Simone Gusmão Ramos 
-
2. Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho 
-
3. Prof. Dr. Konradin Metze 
-

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

Data: 20/07/2009

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Vieira, Gislaine

V673a Análise da textura de fibras elásticas em aortas de pacientes hipertensos e normotensos / Gislaine Vieira. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Konradin Metze

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

Título em inglês : Texture analysis of the elastic fibers in aortas of normotensive and hypertensive patients

- Keywords:**
- Texture
 - Fibers elastic
 - Aorta

Titulação: Mestrado em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Prof^o. Dr^o. Konradin Metze

Prof^a. Dr^a. Simone Gusmão Ramos

Prof^o. Dr^o. Hernandes Faustino de Carvalho

Data da defesa: 20-07-2009

Dedico este trabalho ao *Darci, Maria e Samuel.*

...palavras não exprimem o que eles significam para mim.

Agradecimentos

Á Deus, pela família, pelos amigos, por ter colocado tantas pessoas especiais em minha vida e por ter me feito uma pessoa persistente.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze, não só pela dedicação em ensinar ciência, mas também pela disposição em ensinar cultura geral... Grande mestre!

Ao Prof. Dr. Lenz pela dedicação que dispensou a mim durante a realização deste trabalho.

A Daniela, em quem descobri uma grande amiga.

Ao Dr Randall Luis Adam, que graças aos programas criado por ele foi possível a realização desta tese. Por toda a dedicação e a disposição em ensinar: meu muito obrigado!

Ao Wagner, ao André, ao Leverson, por ter ensinado a trabalhar no microscópio multifóton.

Ao Sr. Sérgio e a Sra. Rosana que com tanta perfeição executaram a confecção das lâminas.

A banca de qualificação, pelas contribuições que deram a este trabalho.

Aos funcionários da secretaria do departamento de Anatomia Patológica e ao Sr. Rogério.

Á minha mãe que é uma mulher forte, persistente, presente, e mesmo sem ter tido acesso a educação, me estimulou, me incentivou quando minhas esperanças se esvaíam e criou caminhos para que eu chegasse aqui.

Á meu pai, que em silêncio me ensinou tantas coisas.

Ao Samuel, meu amigo, meu confidente, meu braço direito... Meu eterno namorado.

Aos meus irmãos: Jocimara, Samuel, Jociane, Saulo e Eliseu, pela infância feliz e por todas as flores que plantaram em meu caminho.

Ao Alex, Juninho, Lucas, Daniela, Isabela, Devaldo, Nicolas, Laís, Brenda, Alessandra, Cacao e Edilaine.

Aos meus amigos: Raissa, Rafael, Kelly, Carlinhos, Jeude, Kátia, Daniel, Teco, Rúbia e Inês... Por que amigo é coisa pra se guardar.

A Rúbia, Inês, Creuza, Gicélio, Alberto, Afrânio, Dayse, Tatiane, Cristina, Ida e Bety... Por todos os plantões que “vivemos” juntos...

Aos meus colegas e amigos do Labclin e do laboratório do HM Mário Gatti, (em especial do plantão noturno e vespertino) ao Rogério Kuboyama: por todas as poesias que me ensinou...

Ao Sr Marino (*in memorian*), a Sra Dirce, ao Edinei e ao Wagner, por tantas vezes terem me ensinado matemática e física.

Ao Prof. José Claudio, e Prof. Sérgio, que com todas as dificuldades que um colégio público oferece, ainda conseguiram estimular muitas mentes.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para este trabalho: MUITO OBRIGADA.

À FAEPEX, que financiou esse projeto, através dos processos 519.292 538/08.

Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular-
"INFABIC";
CNPq Processo nº: 573913/2008-0, FAPESP Processo no: 08/57906-3

A tragédia das pedras é pensarem ser eternas... a areia do mar um dia já foi pedra.

Rubem Alves

SUMÁRIO

Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1.0 Introdução	
1.1 Aorta.....	16
1.2 Textura.....	18
2.0 Objetivo	
2.1 Objetivos Gerais.	20
2.2 Objetivos Específicos.	20
3.0 Material e Métodos	
3.0 Pacientes.....	21
3.2 Aquisição da imagem.	22
3.2 Reconstrução da imagem.	29
3.3 Análise da imagem.	31
3.4 Análise Computadorizada da Textura.....	32
3.4.1 Pré-processamento das imagens.....	32
3.4.2 Processamento das imagens.....	32
3.5 Contagem de Fibras Elásticas.....	35
3.6 Distancia entreFibras Elásticas.....	35

3.7 Análise Estatísticas.....	38
4.0 Resultado.....	39
5.0 Discussão.....	49
5.1 Limitações do Estudo.....	53
6.0 Conclusão.....	55
7.0 Bibliografia.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

H&E	Hematoxilina e Eosina
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
µm	Micrômetros
nm	Nanômetros
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IC	Instituto Computação
UV	Ultra Violeta
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
BMP	Bit map, Tipo de representação da imagem no qual cada ponto é associado a um valor.
Pixel	“Picture element” (menor ponto da imagem)

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Microscópio.....	23
Figura 2- Microscópio invertido Olympus IX-81.....	25
Figura 3- Software Fluoview v 5.0: disposição inicial do software antes das aquisições da imagem.....	27
Figura 4- Local de rotação da área de varredura.....	28
Figura 5- Step size: ângulo para movimentação motorizada da platina.....	28
Figura 6- Esquema da aorta e local de aquisição das imagens.....	29
Figura 7- Software Cell Sociology: utilizado para reconstrução de imagens..	30
Figura 8- Mosaico: imagem da aorta reconstruída, corada com H&E	30
Figura 9- Gliding Box: caixa deslizadora que percorre toda a espessura da aorta, permitindo a análise da estrutura pixel a pixel	31
Figura 10- Método de construção da matriz de co-ocorrência a partir de uma imagem com sete níveis de cinza.....	33
Figura 11- Exemplo de construção da matriz de co-ocorrência a partir de uma imagem com 7 níveis de cinza.....	34
Figura 12- Layer: Programa para contagem de fibras elásticas.....	36
Figura 13- Perfil da luminância: contagem das fibras elásticas	37
Figura 14- Número de camadas fluorescentes em hipertensos.....	39
Figura 15- Distância entre as fibras fluorescentes.....	40
Figura 16- Aorta de paciente normotenso.....	41

Figura 17- Aorta de paciente normotenso.....	41
Figura 18- Desvio Padrão das fibras fluorescentes em pacientes normotensos.....	42
Figura 19- Desvio Padrão da Homogeneidade Local em pacientes normotensos.....	43
Figura 20- Variação da Entropia em toda a espessura da aorta.....	44
Figura 21- Áreas de Maior Distúrbio Arquitetural (Entropia) em pacientes normotensos.....	45
Figura 22- Desvio Padrão do número de camadas fluorescentes em hipertensos aumenta com a idade.....	46
Figura 23- Contagem de fibras elásticas e lamelas elásticas.....	48

Resumo

Fibras elásticas são componentes essenciais da aorta e remodelamento é acompanhado em muitas doenças e eventos que ameaçam a vida, como dissecação e rupturas. Fibras elásticas podem ser facilmente visualizadas quando coradas com H&E e examinadas por microscopia de fluorescência. Nosso objetivo foi criar um sistema de análise automática da textura das fibras elásticas comparando aorta de pacientes normotensos e hipertensos. O sistema de análise foi composto por Microscópio invertido Olympus IX-81 equipado com scanner FV 300 que utiliza laser FV-5 COMB2, utilizando laser de argônio a 488 nm, objetiva 40x usando óleo de imersão. A espessura da aorta varia de 2 a 3 mm, e a imagem completa foi composta por justaposição de imagens de 220x220 μm utilizando software Fluoview. Para análise foi utilizado o programa gliding box, que é uma caixa deslizadora de 128x128 pixels, que percorre a imagem da aorta pixel a pixel em toda sua extensão. Para análise computadorizada da textura foram utilizados programas computacionais (entropia, homogeneidade local e segundo momento angular derivado da matriz de co-ocorrência de Haralick). Foram calculados e plotados em diagramas resultados equivalentes à topografia histológica da imagem. Em cada caminho o gliding box percorreu entre 2000 e 3000 pixels da textura, revelando a topografia local e sua variação. Foi comparada a textura de fibras elásticas de cortes histológicos corados com HE de 24 pacientes normotensos e 30 hipertensos, adultos de ambos os sexos oriundos de autópsias realizadas no Depto de Anatomia Patológica. Para comparação entre textura e idade utilizou-se Correlação de Pearson, e a textura foi comparada entre os grupos com o auxílio do teste t. Resultados: Tanto nos pacientes normotensos como nos hipertensos não houve correlação entre: número de fibras elásticas ou distâncias entre elas, para as análises de Haralick e idade dos pacientes. No entanto, a entropia em pacientes normotensos ($r=0,60$; $p=0,004$) e a

homogeneidade local ($r=0,43$; $p =0,049$) demonstraram acréscimo da variação topográfica com o envelhecimento, fato que não ocorreu nos hipertensos. Quando comparadas com aortas normotensas, as hipertensas revelaram menos fibras elásticas ($p<0,0001$), maior variabilidade e distâncias ($p<0,0001$), aumento da média da espessura e maior variabilidade da espessuras das fibras ($p<0,0001$). Conclusão: Demonstramos que o presente método é uma ferramenta que permite uma análise objetiva da textura de fibras elásticas da aorta com a possibilidade de quantificar processos patológicos. Observamos que em pacientes normotensos, o número médio de fibras elásticas e a distância entre elas são constantes e ocorrem discretas alterações da arquitetura com o aumento da idade. Em hipertensos, o distúrbio arquitetural é mais evidente e ocorrem perdas de fibras elásticas.

Abstract

The elastic fiber network is an essential component of the aorta. Its remodeling accompanies many diseases and may provoke life-threatening events, such as dissection or rupture. Elastic fibers can be easily demonstrated in eosin-stained histologic sections examined by fluorescence microscopy. The aim of our study was to create an automatic texture analysis system of the elastic fibers and to apply it in human aortas comparing normotensive and hypertensive patients.

The analysis system was composed of an Olympus IX-81 inverted microscope, a FV300 scan head and a FV-5 COMB2 laser combiner. The fluorescence of the hematoxylin and eosin-stained slides was excited with the 488 nm line of an Argon laser using a 40x oil immersion objective. The Fluoview software was used to reconstruct the images. The full image of the whole sample (2 or 3mm long) was composed by several 220x220. Then a gliding box of 128x128 pixels was running in 1-pixel steps along a predefined axis parallel to the bottom line of the image. For every new box, computerized analysis of texture features (entropy, local homogeneity and the second angular moment derived from the gray-level co-occurrence matrix) were calculated and plotted in diagrams, where the position on the x-axis was equivalent to the topography in the histologic picture. In that way for each "run" of the gliding box about 2000 to 3000 values of a texture feature were obtained, thus revealing precisely its topographic position and its variability. We compared the elastic fiber texture in routinely HE-stained histologic slides of the aorta ascendens in 24 normotensive and 30 hypertensive adult patients of both sexes and of similar age from our autopsy files. Pearson correlations were calculated between the texture features and the age. Texture features were compared between both groups with the help of the t-test. Results: In normotensive and hypertensive

patients no correlations were found between the number of elastic fibers, their thickness or their distance and the Haralick features and the age of the patients. But in normotensive patients entropy ($r=0,60$; $p=0,004$) and local homogeneity ($r=0,43$; $p=0,049$) showed increasing topographic variations in patients with advanced age, which was not the case for hypertensive patients. When comparing with normotensive aortas, the hypertensive ones revealed less elastic fiber layers ($p<0,0001$), a greater variability of the fiber distance ($p<0,0001$), increased mean fiber thickness and a greater variability of the fiber thickness ($p<0,0001$). Conclusion: We showed that the presented method provides a new tool for an objective automatic texture analysis of the elastic fiber texture of the aorta with the possibility of quantification of the disease process. Although in normotensive patients, the mean number and distance of the elastic fibers is constant, discrete local alterations of the architecture appear with increasing age. In hypertensive patients there are more pronounced architectural alterations with loss of the fiber layers.

1.0 Introdução

As grandes artérias elásticas contribuem para a estabilidade do fluxo sanguíneo. As artérias elásticas incluem a aorta e seus ramos (Junqueira e Carneiro, 1995).

1.1 Aorta

A aorta humana é composta por três túnicas: íntima, média e adventícia.

A íntima apresenta uma camada de células endoteliais, apoiada em uma camada de tecido conjuntivo frouxo, camada subendotelial, a qual pode conter, ocasionalmente, células musculares lisas (Junqueira e Carneiro, 1995).

A média é constituída principalmente por camadas concêntricas de células musculares lisas organizadas helicoidalmente. Interpostas entre as células musculares lisas existem varias camadas de fibras e lamelas elásticas, fibras colágenas do tipo III, proteoglicanas e glicoproteínas. (Junqueira e Carneiro, 1995; Berry et al 1975; Silver et al, 1989; Halloran 1995, Choudhury 2008). As lâminas elásticas contribuem com a importante função de tornar o fluxo sanguíneo mais uniforme. Durante a sístole, a lamina elástica está distendida e reduz a variação da pressão. Durante a diástole, a pressão no ventrículo cai para níveis muito baixos, mas a propriedade elástica das grandes artérias ajuda a manter a pressão arterial, com isso a variação da pressão arterial e da velocidade do sangue diminui e se tornam mais estáveis à medida que se distanciam do coração (Junqueira e Carneiro, 1995).

A adventícia consiste principalmente em colágeno do tipo I e fibras elásticas. Esta camada possui vaso vasorum, que são pequenos vasos cuja função é irrigar a adventícia e a parte externa da média (Junqueira e Carneiro 1995).

A estrutura normal dos vasos, particularmente da aorta, sofre progressivas mudanças durante a vida, tais como, aumento do diâmetro com a idade, discretas fragmentações das fibras elásticas e alargamento dos espaços interlamelares (Gallagher, 1997). Na hipertensão arterial sistêmica (HAS), podem-se encontrar dilatação do lúmen vascular, espessamento da parede com hiperplasia (aumento da matriz extracelular) e um maior índice de fragmentação de fibras elásticas em relação aos normotensos, causando assim um remodelamento na arquitetura da aorta (Mattos, 2001; Virmani 1991, Limas et al, 1982, Prado et al, 2007, Nakashima et al 1990).

Fibras elásticas são componentes essenciais da aorta. Seu remodelamento é acompanhado em muitas doenças e está relacionado a eventos que ameaçam a vida como dissecação ou ruptura. (Hagam et al 2000; Larson et al 1984; Roberts 1981; Benetos 2002; Fievez 1989). Borges e col. (2008) descreveram que ocorre uma acentuada fragmentação de fibras elásticas na camada média nas dissecações de aorta.

A fibra elástica madura apresenta dois principais componentes: um amorfo central, que representa 90% do conteúdo e encerra a proteína elastina e outro microfibrilar, periférico, de natureza glicoprotéica. (Mecham e Davis, 1994). Elas são formadas na parede dos vasos sanguíneos pela agregação no meio extracelular de elastina (Mecham e Broekelmann, 1995).

Fibras elásticas podem ser facilmente demonstradas pela coloração de hematoxilina eosina (H&E) nos cortes histológicos quando visualizadas à microscopia de fluorescência (Carvalho e Taboga, 1996). Esta coloração é utilizada rotineiramente nos serviços de anatomia patológica.

1.2 Textura

Os parâmetros da análise de imagem podem ser usados com a vantagem de se estimar pequenas mudanças na morfologia celular que não são óbvias ao olho humano, ou são invisíveis, ou são difíceis de incluir numa descrição qualitativa. 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 (Adam, 2002).

A textura é uma característica que descreve a aparência de parte de uma imagem e é freqüentemente expressa como macia, arenosa, regular, grosseira e granular. (Haralick et al. 1973).

A textura da imagem histológica ou citológica dos tecidos está intimamente relacionada com o estado fisiológico e com o distúrbio fisiopatológico do organismo, o que é à base da análise microscópica.

Tradicionalmente, a análise da textura microscópica histológica e citológica é feita pela opinião do especialista treinado. Esse tipo de avaliação, porém, contém um forte componente subjetivo, o que explica o considerável grau de discordância entre os especialistas em todos os campos da histopatologia ou citopatologia (Christopher e Hotz, 2004). Isso explica as tentativas de objetivar o processo diagnóstico, utilizando-se ferramentas matemáticas aplicadas na análise de imagens microscópicas (Metze e Adam, 2005).

Poucos trabalhos na literatura têm discutido a estrutura das fibras elásticas da aorta através da análise automática, e a literatura carece de trabalhos que analisem não só o número de fibras e a distâncias entre elas, mas também a disposição e homogeneidade das mesmas.

Nakashima et al (1990), através de observador humano, fizeram contagem de fibras elásticas e analisaram o índice de fragmentação em normotensos e hipertensos, porém os pesquisadores não discutiram a homogeneidade e o grau de desorganização das fibras. Sans e Moragas (1992) estudaram a estrutura das fibras, no entanto o trabalho é focado na quantidade de fragmentação das mesmas. Angouras et al (2000), observaram a disposição das fibras elásticas em aortas de suínos, a análise foi por observação humana e, conseqüentemente, dependente da subjetividade destes.

Diante deste contexto, este trabalho propõe uma nova ferramenta (análise automática) para o estudo da arquitetura da aorta, que independe da subjetividade do observador humano.

2.0 Objetivo

2.1. Objetivo geral

- Criar um sistema automático de análise de textura para fibras elásticas.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever a topografia de fibras elásticas de aortas ascendentes em pacientes normotensos e hipertensos;
- Localizar topograficamente áreas de maior distúrbio arquitetural;
- Comparar aortas de pacientes normotensos e hipertensos;
- Analisar a textura da aorta torácica por meio de imagem digital; utilizando matriz de co-ocorrência de Haralick e contagem de fibras.

3.0 Material e Métodos

O presente trabalho conta com dois grupos de pacientes, um de portadores de hipertensão arterial e outro de normotensos.

Para seleção dos pacientes foram analisados os prontuários médicos e relatório de autópsia de todos pacientes. Na análise do relatório de autópsias observou-se histologia renal, histologia cardíaca e peso do coração em comparação com altura e peso corporal do indivíduo.

Critérios de inclusão para o grupo de pacientes normotensos:

- Ausência de aterosclerose macroscópica na aorta ascendente próxima à pulmonar;
- Ausência de medicação anti-hipertensiva;
- Peso do coração normal em relação ao peso corporal e altura do paciente. (0,4% do peso do corpo, sendo permitida uma tolerância de 10%.);
- Histologia renal sem alteração (ausência de nefrosclerose);

Nenhum paciente deste grupo era portador de diabetes.

Critérios de inclusão para o grupo de pacientes hipertensos:

- Ausência de aterosclerose macroscópica na aorta torácica próxima a pulmonar;
- Uso de medicamento anti-hipertensivo;
- Diagnóstico de Hipertensão arterial sistêmica (HAS);
- Hipertrofia das câmeras cardíacas (sem valvulopatia ou cardiomiopatia hipertrófica)

Em conjunto com alterações renais típicas da HAS.

Critérios de exclusão:

Foram excluídos dos grupos, aqueles pacientes que, apresentaram na aorta ascendente/ torácica aterosclerose moderada ou grave na aorta abdominal, qualquer doença ou situação que pudesse comprometer a estrutura da aorta: usuários de crack, (On et al, 1992), gestantes e portadores da Síndrome de Marfan.

Os blocos utilizados pertencem ao blocário do departamento de Anatomia Patológica e a confecção das lâminas foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental. Os cortes histológicos foram feitos com 15 μm de espessura e posteriormente corados com hematoxilina-eosina.

A região da aorta de onde foram adquiridas as imagens estava livre de aterosclerose microscópica.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da FCM, UNICAMP CEP Nº 549/ 2007.

3.1 Aquisição da imagem

3.1.1 Microscópico Confocal de varredura a laser

Na microscopia de fluorescência convencional o sinal de fluorescência coletado da amostra é gerado em todo o cone de iluminação da amostra. Esse fato diminui a resolução no plano focal da objetiva, pois o sinal coletado contém informação de todos os outros planos diferentes do plano focal da objetiva. Para a reconstrução 3D é preciso rejeitar as informações advindas dos planos

indesejados. Essa discriminação é obtida através da utilização de um filtro espacial, que impede que sinais gerados fora do foco da objetiva cheguem ao detector (Thomaz, 2007). A figura 1 mostra um esquema simplificado do Microscópio Confocal de Varredura a Laser.

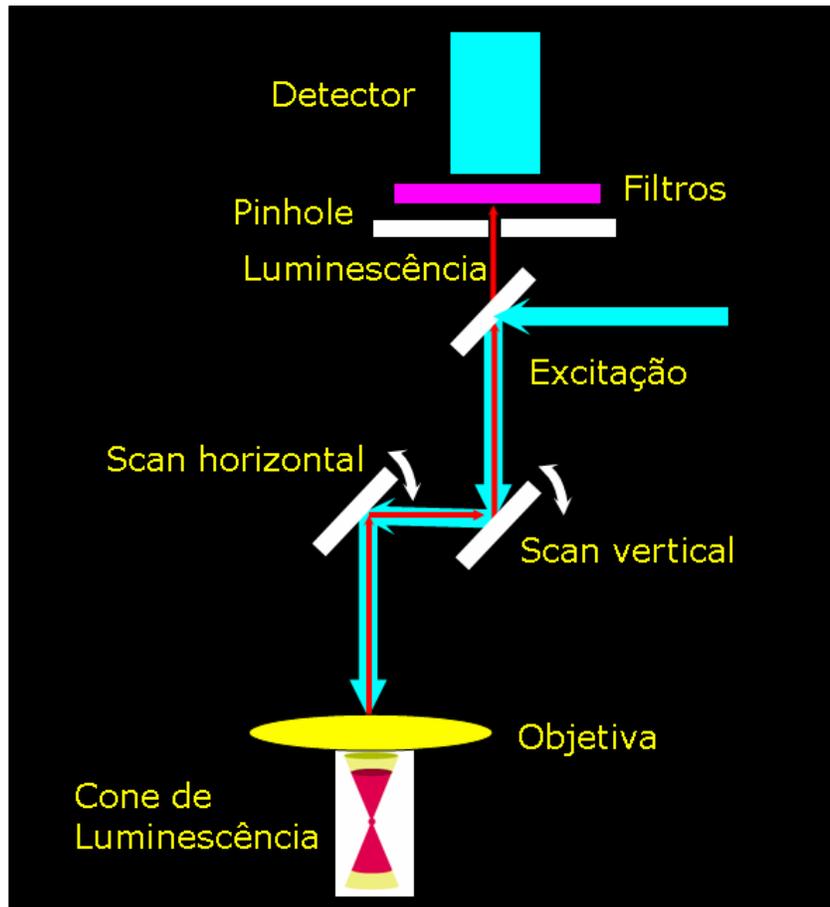


Figura 1 Microscópio Confocal de Varredura a Laser

O microscópio invertido Olympus IX-81 (figura: 2), equipado com scanner FV300, laser de argônio FV-5 COMB2, é um protótipo criado pelo laboratório de Fotônica do Instituto Física Gleb Wathagin. A possibilidade de utilizar este equipamento nas aquisições de imagens permite algumas vantagens em relação a outros equipamentos ópticos convencionais, tais como: maior resolução em imagens em três dimensões em relação à lâmpada de mercúrio, com a possibilidade de reconstrução de imagens

tridimensional e maior visualização em profundidade do tecido a ser observado.

Graças à tecnologia que emprega o uso de compostos químicos denominados fluoróforos, foram possíveis grandes avanços na pesquisa de organismos vivos. Essa combinação de princípios da óptica e da físico-química tornou finalmente possível “olhar de perto” variados tipos de células vivas. (Thomaz, 2007).

A fluorescência acontece por um fenômeno onde elétrons do fluoróforo absorvem fótons com energia provindos de uma fonte. (lâmpada ou feixe laser), passam de um estado fundamental (baixa energia) para um estado excitado (alta energia), neste estado o fluoróforo passa por uma mudança em sua conformação e pode interagir com uma série de moléculas ao seu redor. Com isso a energia deste estado excitado é dissipada e o elétron passa para um estado de menor energia (não o estado fundamental). A diferença de energia entre o estado excitado e o estado de menor energia é emitida em forma de um fóton (Thomaz, 2007)

A técnica de microscopia de fluorescência consiste justamente em captar este fóton que é emitido e com ele gerar uma imagem. (Thomaz, 2007). Estes procedimentos permitem maiores detalhamentos de estruturas (Koning et al, 2001).

As imagens foram adquiridas, utilizando laser de argônio a 488 nm, objetiva 40x com óleo de imersão e resolução de 2 micrômetros por pixel.

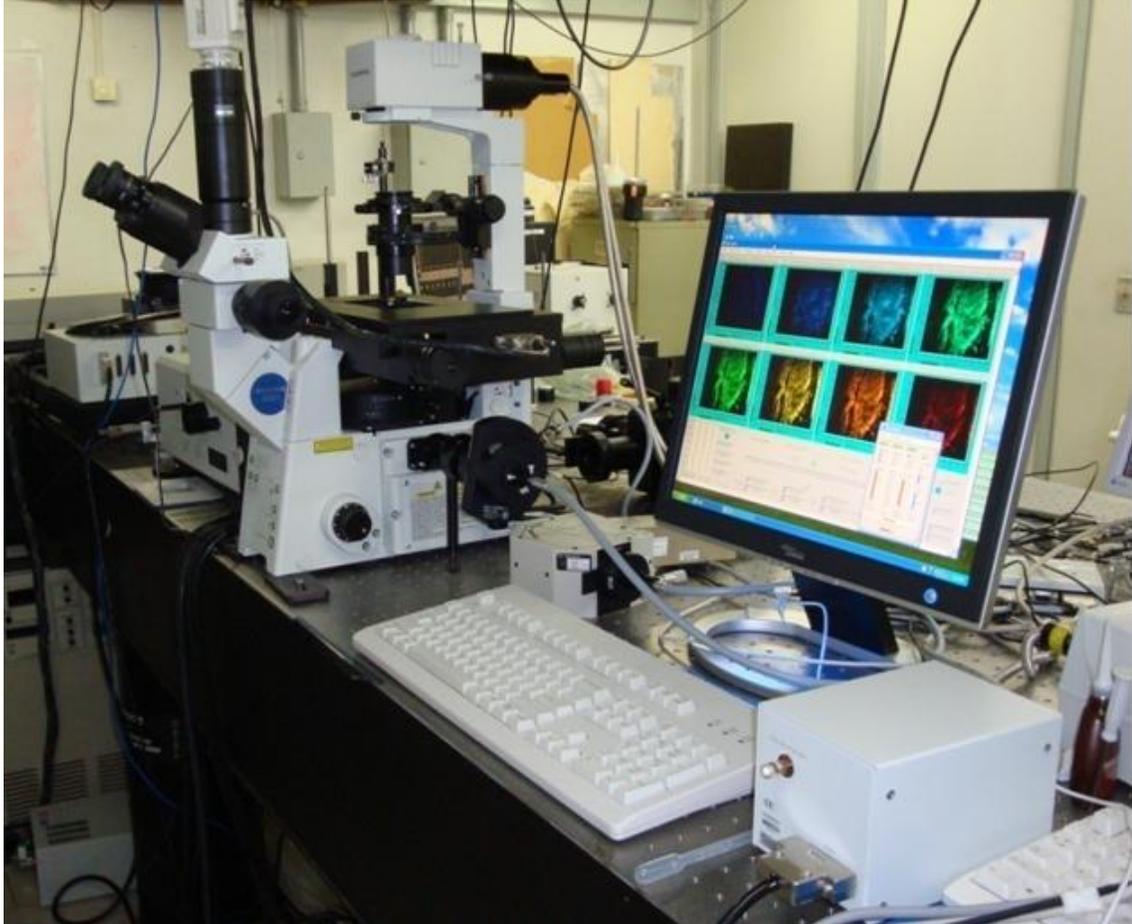


Figura: 2 Microscópio invertido Olympus IX-81

Neste sistema as imagens são adquiridas com o software *Flouview 5.0* v. (figura: 3). Para que os programas de análise computacional possam analisar as imagens é necessário que as mesmas sejam adquiridas com as fibras elásticas na posição vertical. Para isso, posicionou-se a objetiva na camada íntima e foi feita a rotação da área de varredura, *scan size*, (figura: 4) até que as fibras ficassem na vertical, anotou-se o ângulo fez-se o calculo do seno e cosseno e os valores encontrados foram inseridos na região do programa que permite a movimentação motorizada da platina *step size* (figura:5).

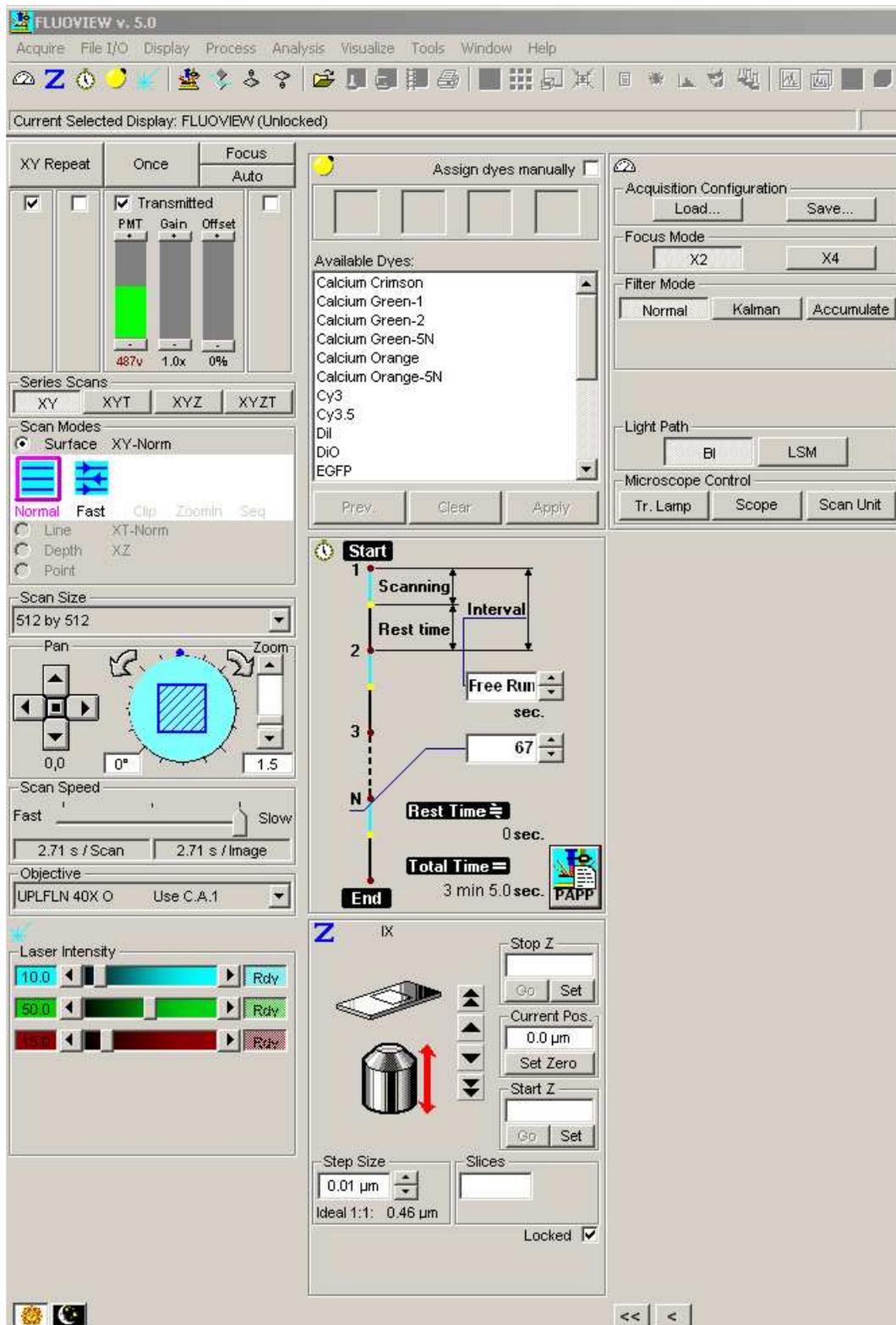


Figura: 3 Software Fluoview v. 5.0: disposição inicial do programa antes da aquisição de imagens.

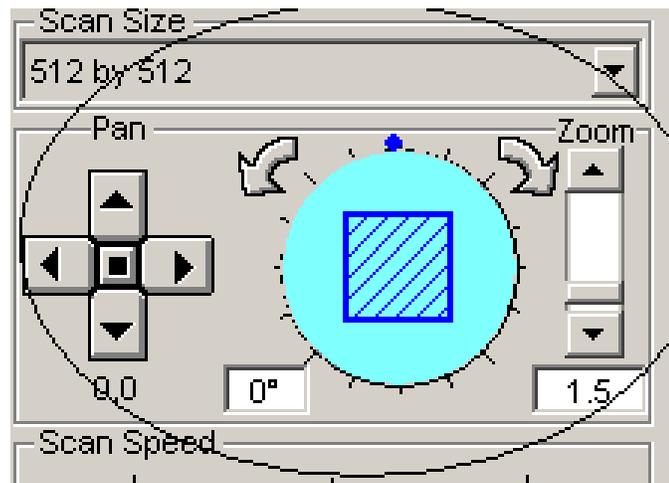


Figura: 4 Local onde se faz rotação da área de varredura

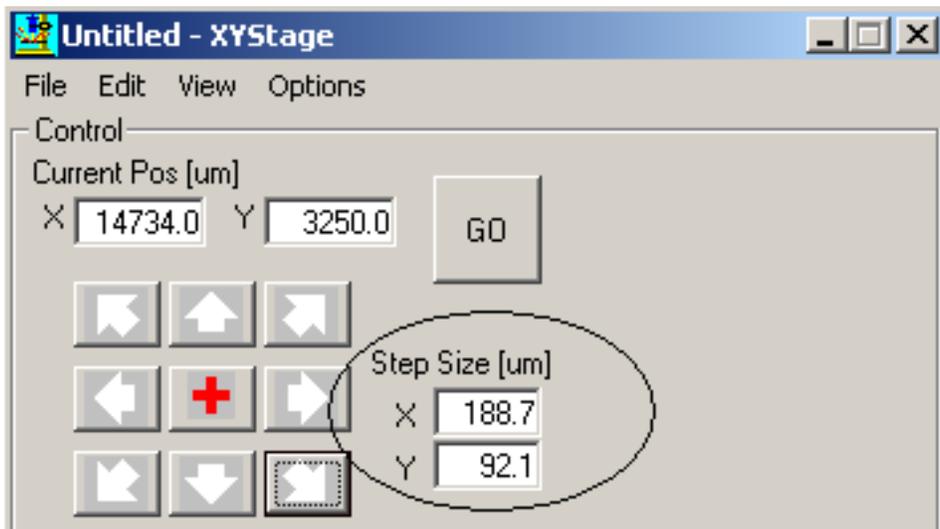


Figura: 5 Step size: ângulo para a movimentação motorizada da platina.

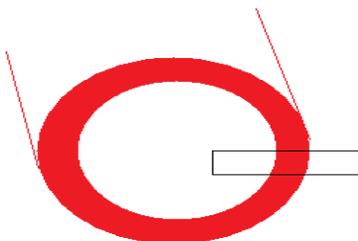


Figura: 6 Esquema da aorta e local de aquisição da imagem.

As aquisições foram feitas a partir da túnica íntima até a adventícia, salvas no formato TIF e posteriormente convertidas para bitmap de 24 bits (extensão BMP).

Cada área de varredura atinge até 220 μm , a espessura da aorta varia de 2 a 3 mm, e a imagem completa foi composta por justaposição de imagens de 220x220 μm .

3.2. Reconstrução da imagem

Para reconstrução da imagem foi utilizado o programa *Cell Sociology* (programa desenvolvido pelo Dr Randall Luis Adam, pesquisador colaborador da Unicamp) (figura: 7) e as imagens de fluorescência foram justapostas uma a uma na ordem da aquisição, fazendo uma da imagem total da aorta. A esta reconstrução da imagem damos o nome de “mosaico”. Figura 8.

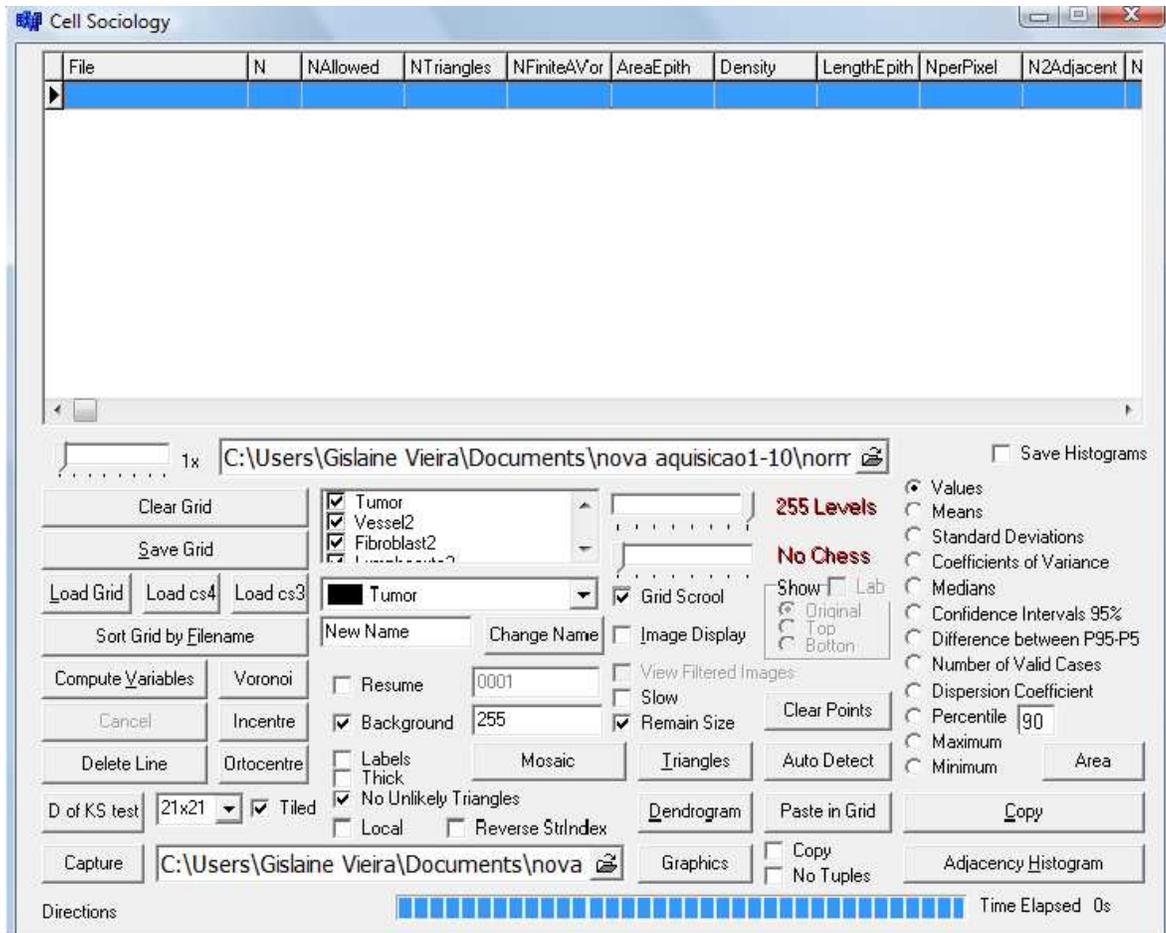


Figura:7 Página inicial do software Cell Sociology

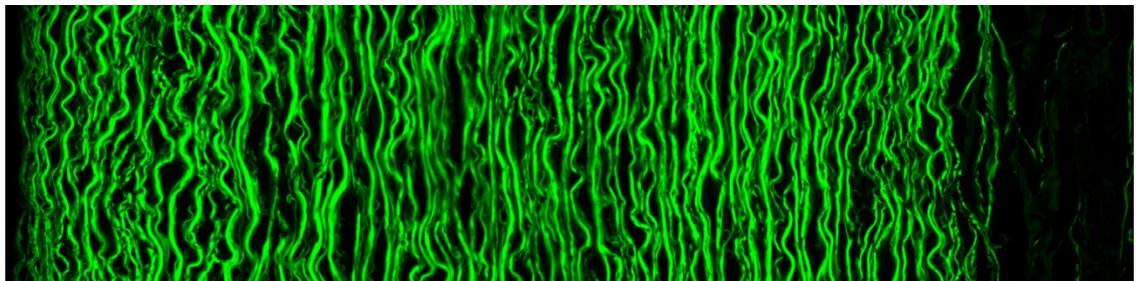


Figura:8 Imagem da espessura aorta reconstruída “mosaico”. (fluorescência da eosina, dimensão longitudinal: 1536 μm).

3.3 Análise da imagem

Os programas de processamento não conseguem processar imagens com as dimensões do “mosaico”, então, usou-se o software “*gliding box*”. Este programa percorre imagem da aorta em toda a espessura, pixel a pixel, (0,54 μm), permitindo a análise da textura local. Figura: 9.

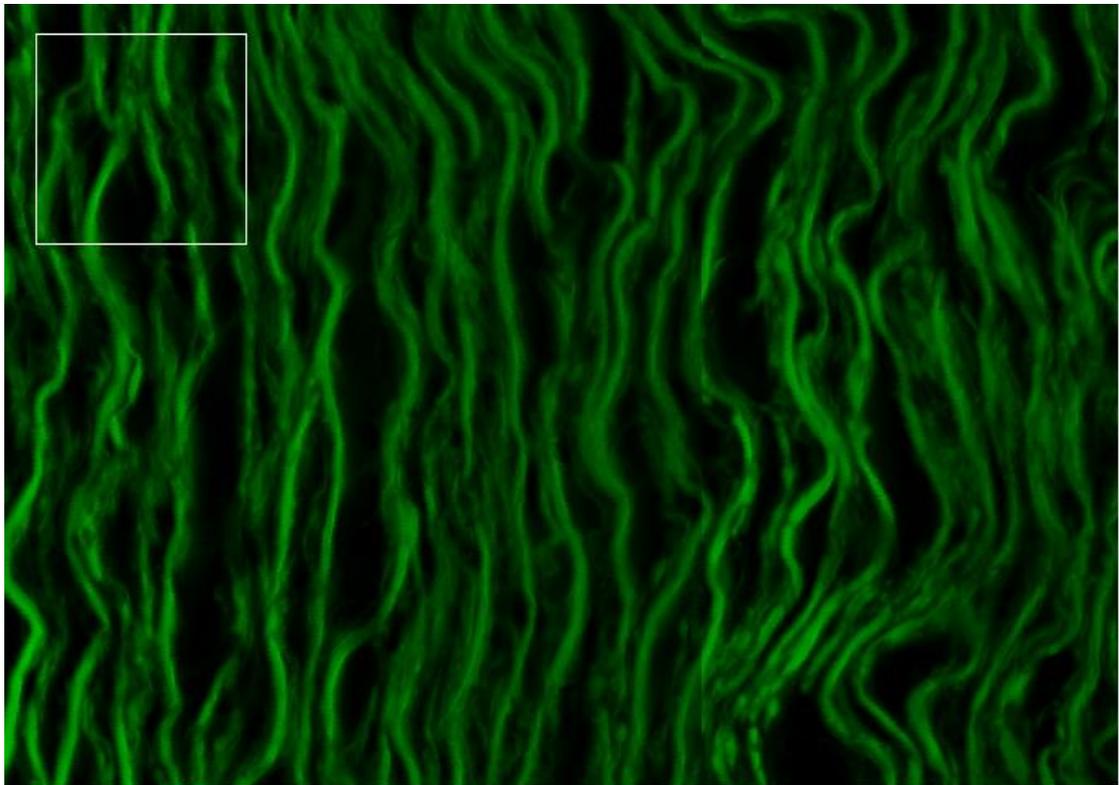


Figura: 9 “gliding box”: caixa deslizadora que percorre toda a espessura da aorta, permitindo a análise da estrutura pixel a pixel.

3.4 Análise Computadorizada da Textura

3.4.1 Pré-processamento das imagens

As imagens foram convertidas em escalas de cinza, extraindo-se a luminância (nível de cinza) de cada pixel, 0: ausência de luz e 255: brilho intenso. Esta é a escala perceptivelmente uniforme em relação à visão humana em cores (Van der Wouwer, 2000).

3.4.2 Processamento das imagens

As características texturais foram calculadas de acordo com Haralick et al. (1973). Das imagens transformadas, são extraídos níveis de cinza (luminância) de cada pixel (menor elemento que compõe a imagem) e construída uma matriz de co-ocorrência.

A matriz de co-ocorrência é uma matriz simétrica em relação a sua diagonal principal, onde cada elemento na posição i,j indica o número de vezes que um pixel com nível de cinza i tem um vizinho com nível de cinza j (figura: 10 e 11), semelhante a um histograma bidimensional.

$$(i; j) = \frac{P(i; j)}{R}$$

R

Onde R é o número total de pares de pixels utilizados para se construir a matriz de co-ocorrência.

Imagens suaves, com mudanças pouco abruptas de luminância, geram matrizes de co-ocorrência em que os dados se concentram em torno da diagonal principal. (Adam, 2002)

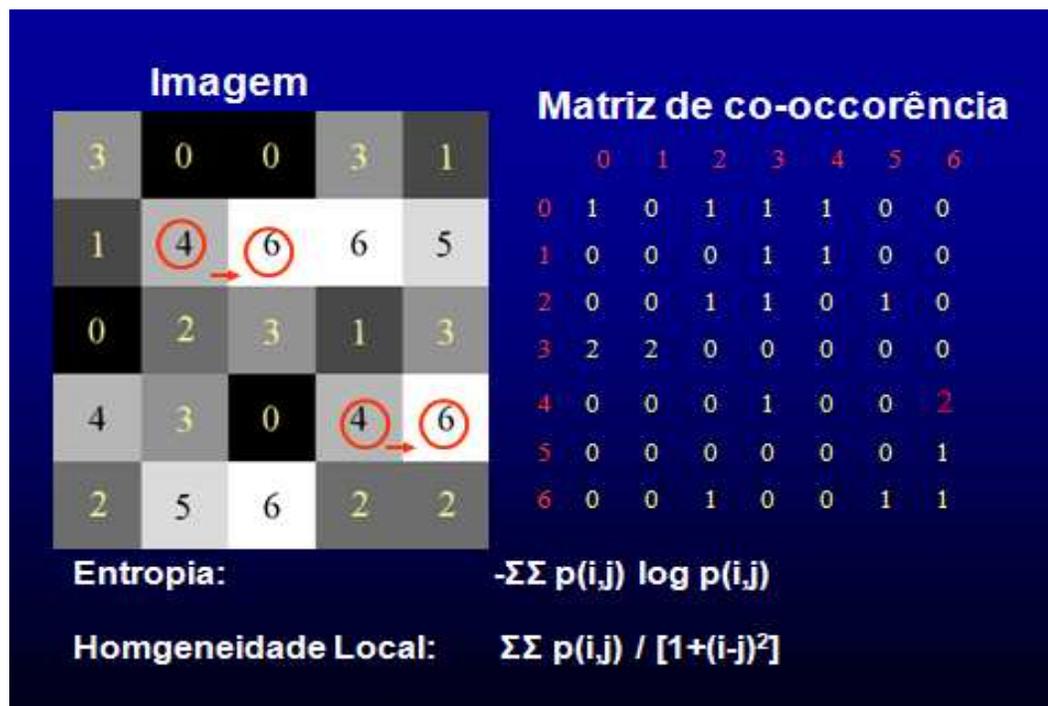


Figura: 10 Método de construção da matriz de co-ocorrência a partir de uma imagem com sete níveis de cinza

Matriz de Co-Ocorrência

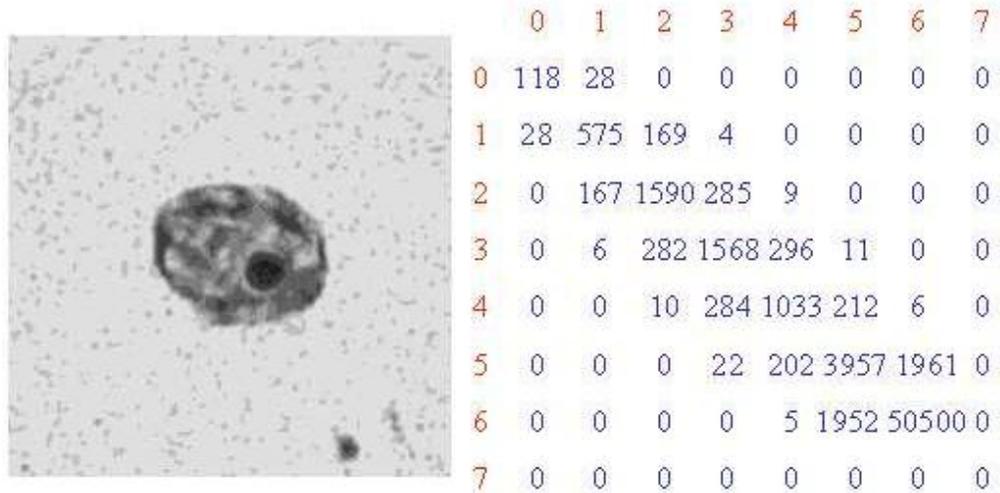


Figura: 11 Método de construção da matriz de co-ocorrência (a direita), a partir de uma imagem com 7 níveis de cinza (a esquerda).

Entropia: Entropia da Matriz de co-ocorrência Haralick mede o número de transições entre os diferentes graus de cinza na imagem. (Kayser et al, 2007). A entropia mede o grau de desorganização de fibras, regiões da aorta onde há maior homogeneidade há menores valores de entropia e regiões muito heterogêneas há maiores valores.

Homogeneidade local: Homogeneidade local da Matriz de co-ocorrência Haralick mede a homogeneidade da imagem.

Segundo Momento Angular: Segundo Momento Angular da Matriz de co-ocorrência Haralick que representa a suavidade da imagem (Theodridis e Koutroumbas, 2006);

3.5 Contagem de Fibras elásticas

A contagem de fibras foi realizada pelo programa *Layer* (programa a ser registrado no INPI desenvolvido pelo Dr Randall Luis Adam, pesquisador colaborador da Unicamp) (figura: 12) utilizando o método *Layers Max*. Para a análise das fibras elásticas, as imagens foram convertidas em escalas de cinza, extraindo-se a luminância de cada pixel (variando do 1, ou seja, ausência de luz até 254, brilho intenso), a contagem ocorre entre estes limiares em uma coluna de pixel. Para cada nível de cinza, um limiar define quantas fibras existem em cada coluna.

A contagem é realizada com as fibras elásticas na posição horizontal e é avaliada, individualmente, cada coluna de pixels de baixo para cima Figura (13).

3.6 Distâncias entre Fibras Elásticas

A análise da distância entre as fibras é intrinsecamente ligado ao método *Layers Max*, a avaliação das distâncias entre elas, são medidas entre transições consecutivas nos limiares em que se obteve a máxima contagem de fibras. Figura 13.

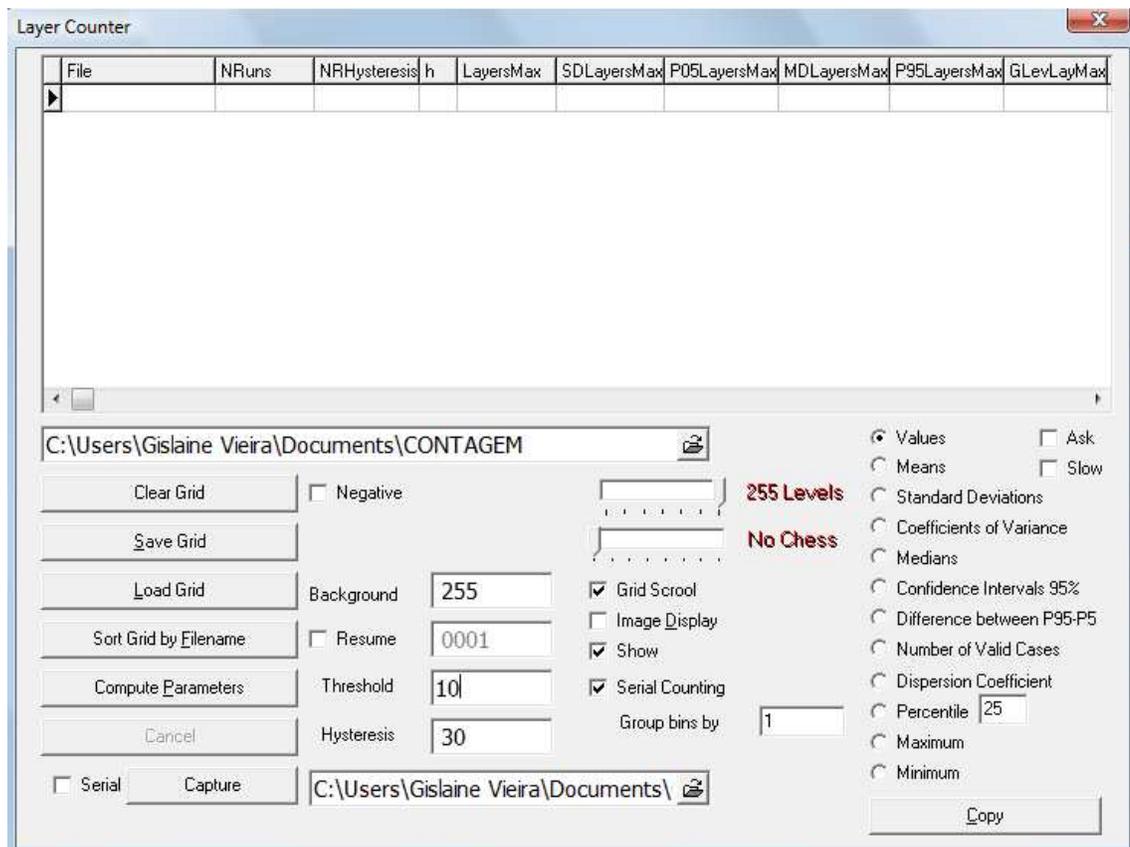


Figura: 12 Layer: Programa para contagem de Fibras

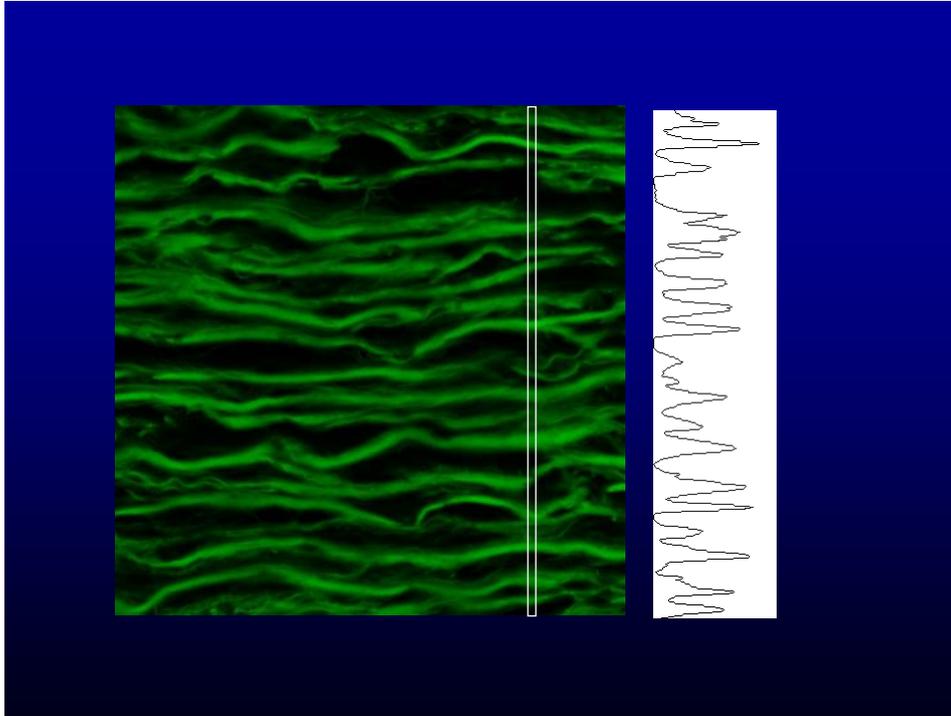


Figura 13: Perfil da Luminância: Contagem das fibras elásticas é realizado em uma coluna de pixel onde se têm o limiar máximo.

3.7 Análises estatísticas:

- A correlação de Pearson foi calculada comparando variáveis da textura e idade.
- As variáveis textura foram comparadas entre os grupos com o auxílio do teste t Student. (Programa Winstat 3.1)

4.0 Resultados

No presente trabalho utilizamos materiais de aortas obtidas de 54 casos de autópsias, sendo que: vinte e quatro eram de pacientes normotensos, dez do sexo feminino e catorze masculino, com idade entre 18 e 60 anos, média 39,69 anos, desvio padrão 14,38 anos; e 30 hipertensos: dezessete do sexo masculino, treze feminino, com idade entre 19 e 78 anos, média: 44,7 anos, desvio padrão 15, 5 anos.

A análise estatística revelou que o número de camadas fluorescente aumenta com a idade em pacientes hipertensos, porém este fator não foi encontrado em pacientes normotensos. Figura: 14

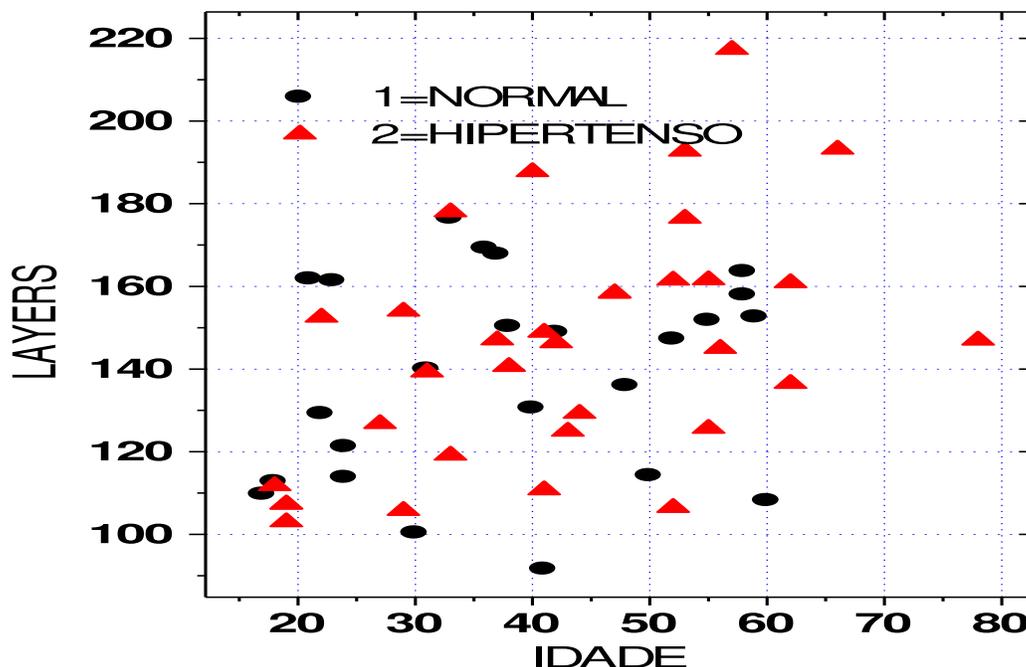


Figura 14. Número de camadas fluorescentes aumenta com a idade em hipertensos ($r=0,43$; $p=0,032$), porém não em normotensos ($p>0,05$).

As distâncias entre as fibras fluorescentes foram significativamente maiores em pacientes hipertensos (teste t, $p = 0,021$) do que em pacientes normotensos. Figura: 15.

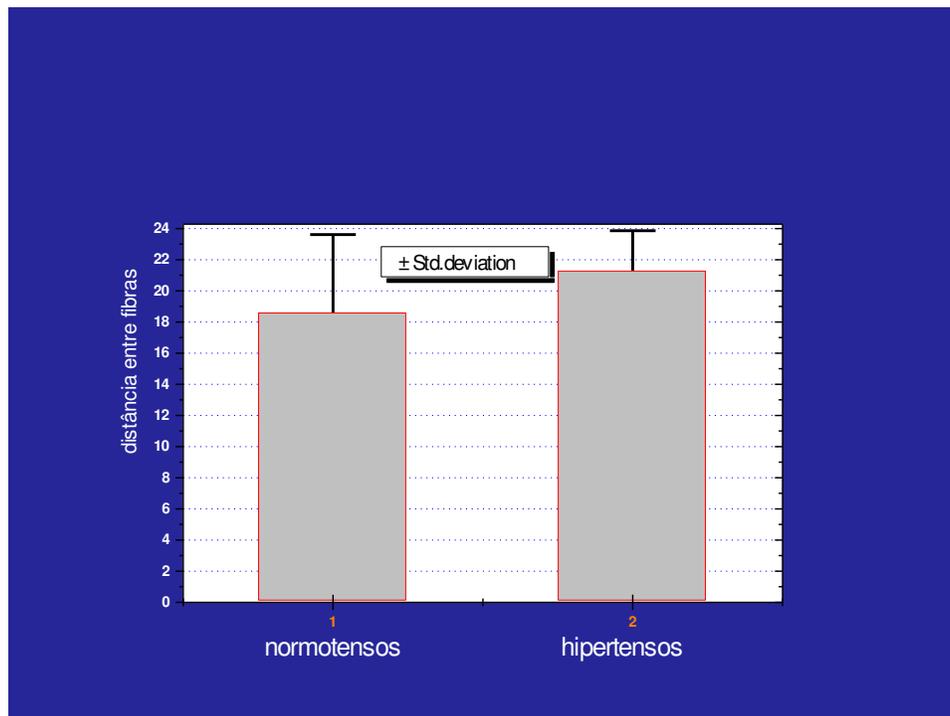


Figura: 15. Distância entre as fibras fluorescentes. Figura 1: representa distâncias entre fibras de pacientes normotensos. Figura 2: representa distâncias entre fibras em pacientes normotensos.

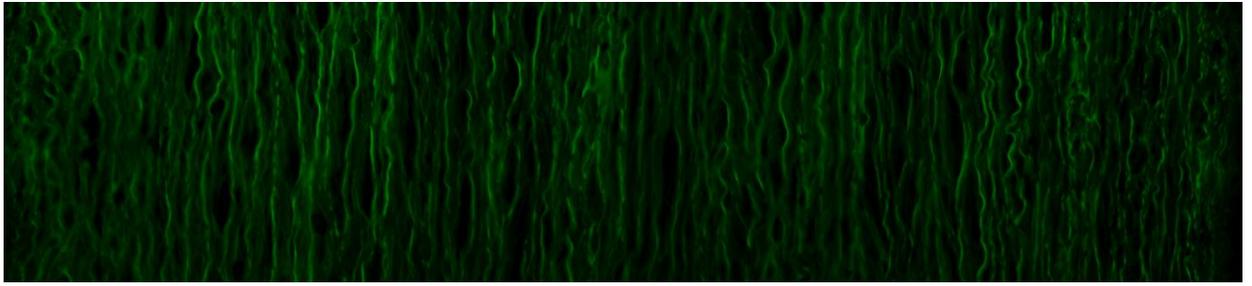


Figura 16. Aorta de paciente normotenso: as distâncias entre fibras elásticas são menores

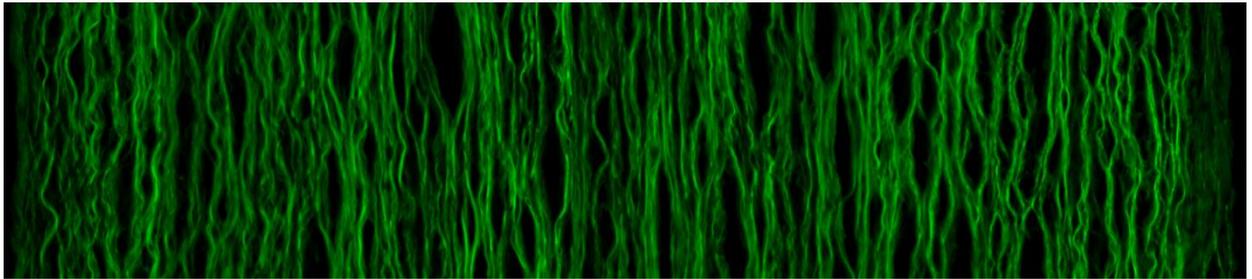


Figura 17: Aorta de paciente hipertenso: maior distância entre as fibras elásticas em relação à aorta de normotensos.

Desvio padrão (variação topográfica) das fibras fluorescentes em pacientes normotensos aumenta com a idade ($R = 0,43$; $p = 0,05$). Figura 18.

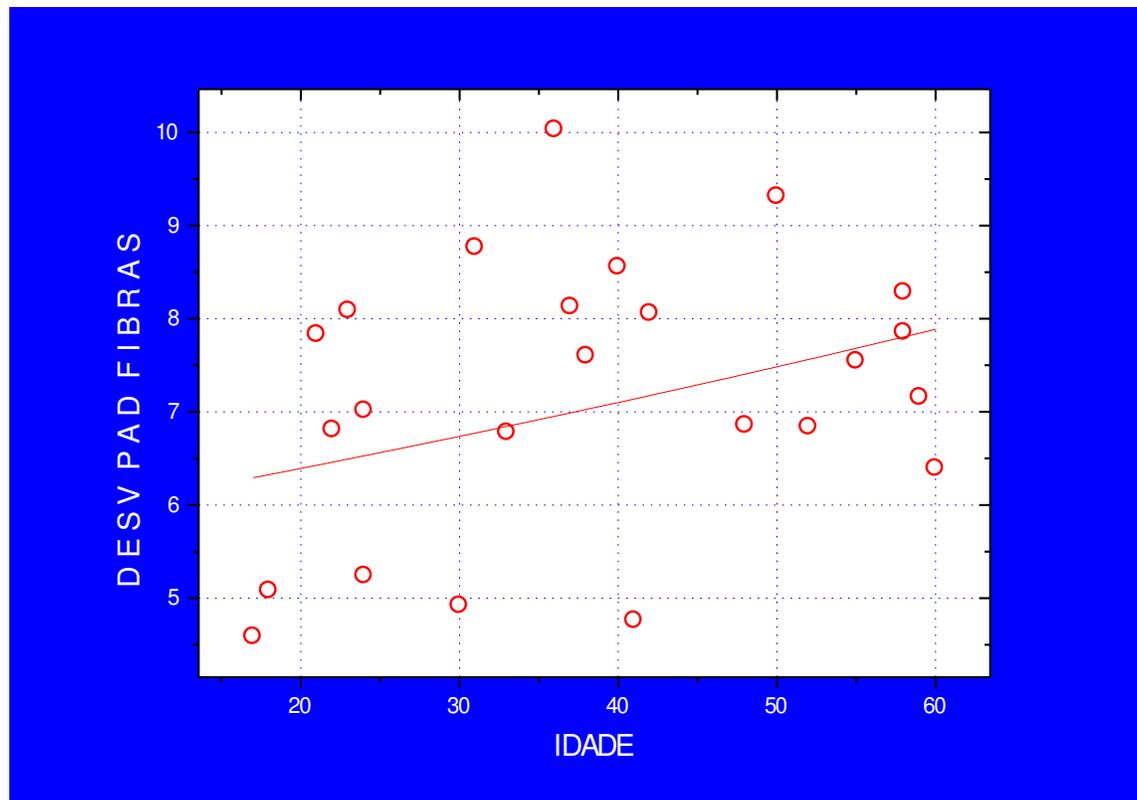


Figura 18. Desvio padrão (variação topográfica) das fibras fluorescentes em pacientes normotensos aumenta com a idade.

Desvio padrão (variação) da homogeneidade local em pacientes normotensos aumenta com a idade ($R = 0,43$; $p = 0,049$). Com o envelhecimento aumentam as variações da homogeneidade. Figura 19.

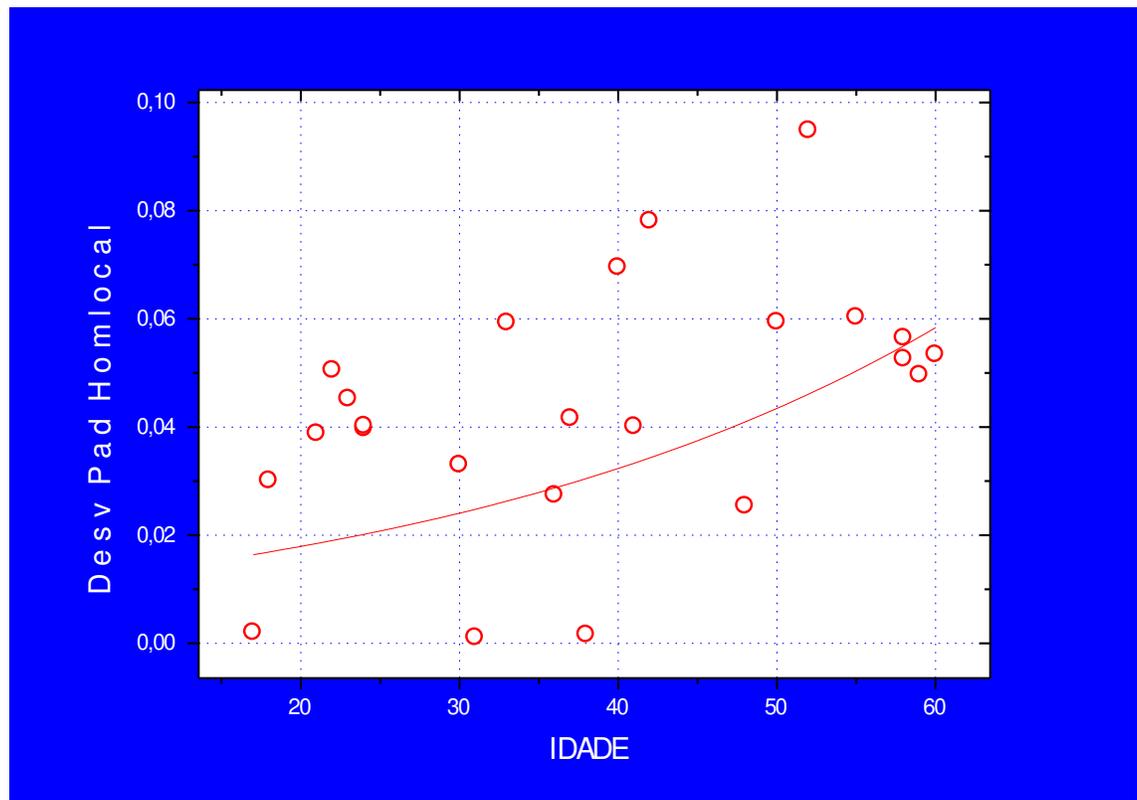


Figura 19: Aumento do desvio padrão (variação) da homogeneidade local em pacientes normotensos aumenta com o envelhecimento.

Analisando-se os valores para a variável entropia, (grau de desorganização das fibras elásticas) foram observadas alterações desta variável em diferentes regiões topográficas na espessura da aorta dos pacientes normotensos. Figura 20.

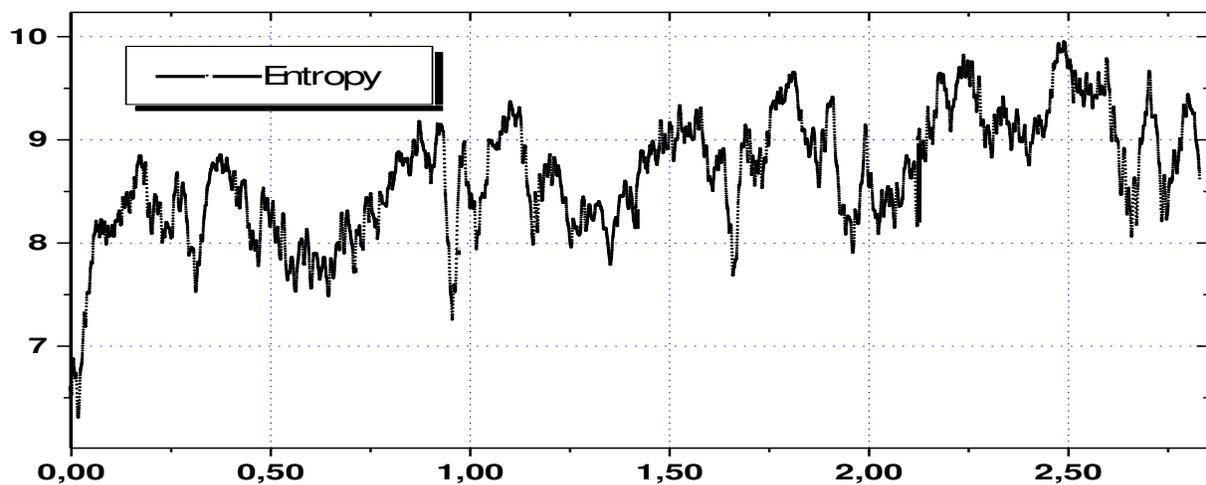
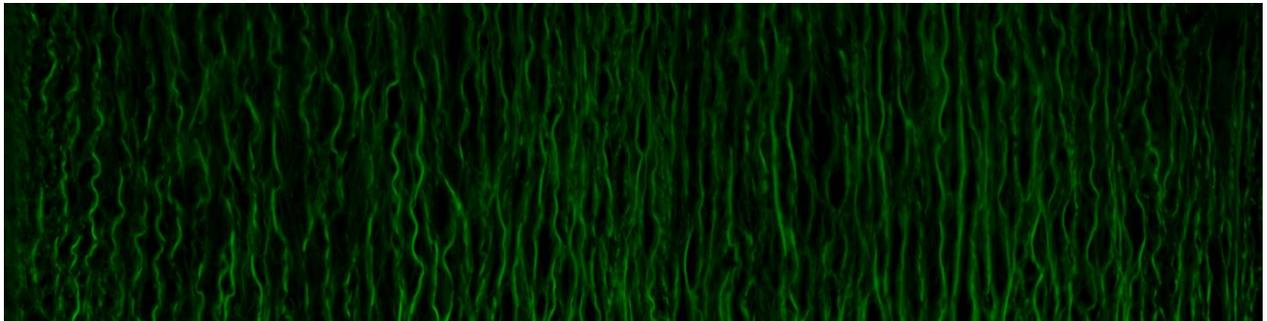


Figura 20: Avaliação da entropia em toda a espessura da aorta de pacientes normotensos. Metodologia: Haralick. Regiões onde ocorre maior grau de desorganização das fibras há maior valor para entropia.

Registramos em cada aorta, dos pacientes normotensos, os 100 *gliding box*, cuja entropia mostra os maiores desvio da entropia média (de cada aorta). Plotamos estas áreas (cada uma representada por um ponto) de todas as aortas normotensas num gráfico. Encontramos um acúmulo de alterações entre 25 e 30% da espessura (a partir da íntima). Figura 21.

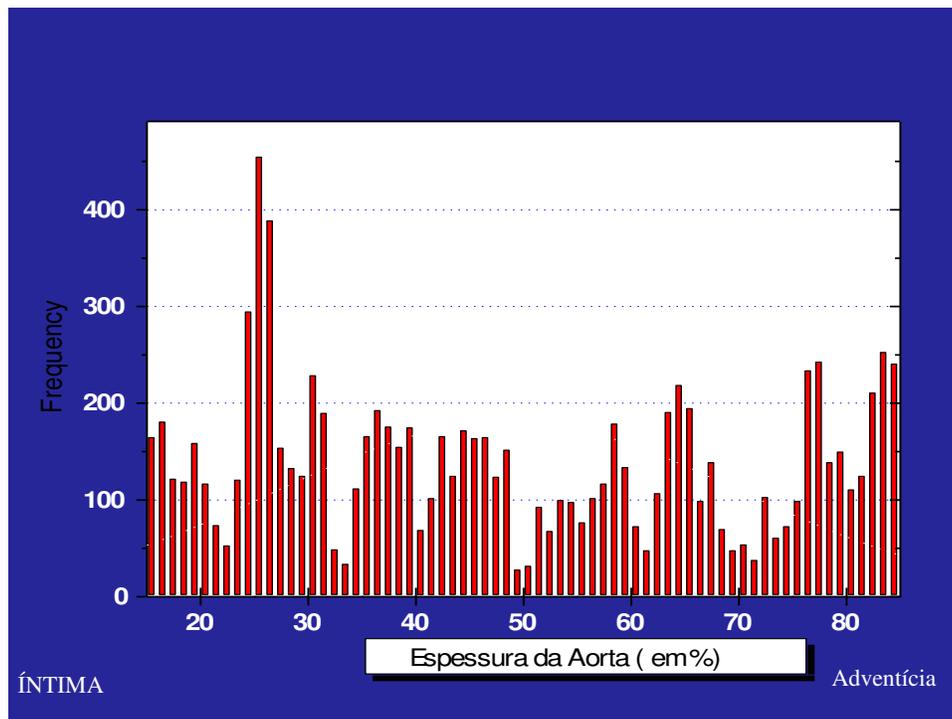


Figura: 21. Áreas de Maior Distúrbio Arquitetural (a partir do Maior Desvio da ENTROPIA) em Pacientes Normotensos. O eixo X representa a espessura da aorta.

O Desvio padrão dos números das camadas (fibras) fluorescentes em pacientes hipertensos aumenta com a idade ($R=0,53$; $p=0,003$). Figura 22.

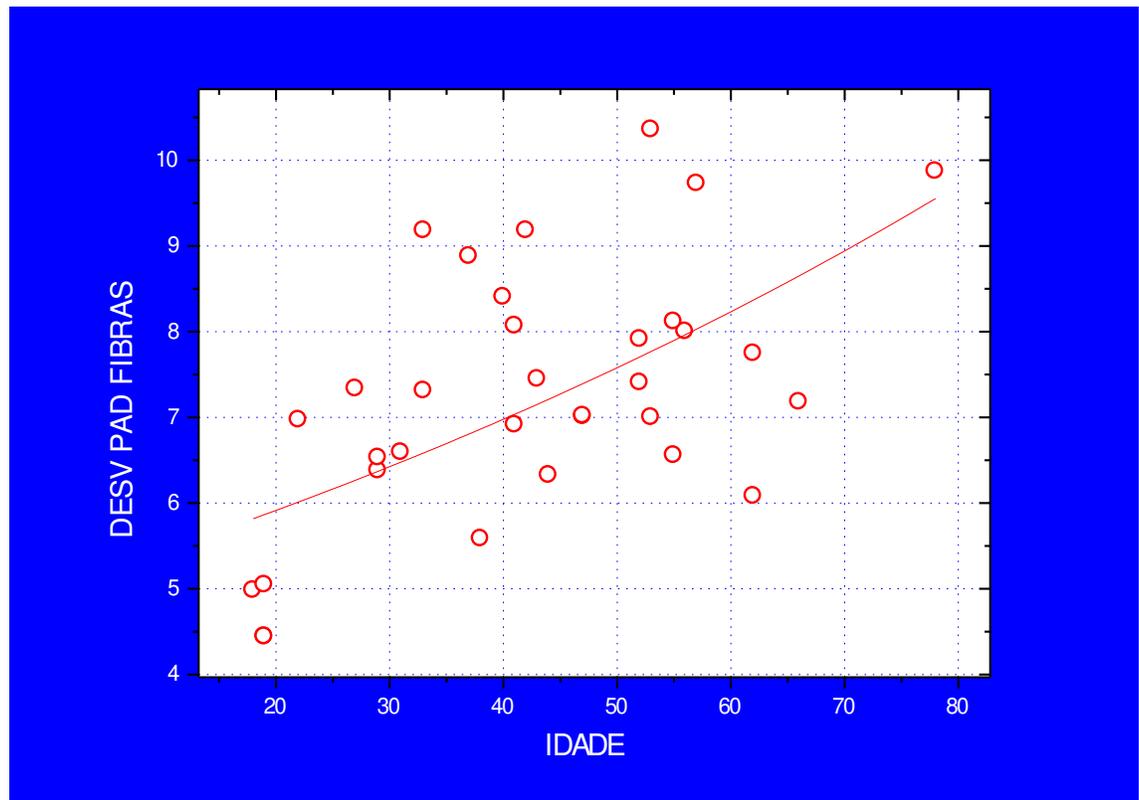


Figura 22: Desvio padrão dos números das camadas (fibras) fluorescentes em pacientes hipertensos aumenta com a idade

A média da contagem de fibras, realizada por análise computacional, foi em média 120 fibras por pacientes adultos. Não houve diferença significativa entre número de fibras fluorescentes de pacientes normotensos e hipertensos.

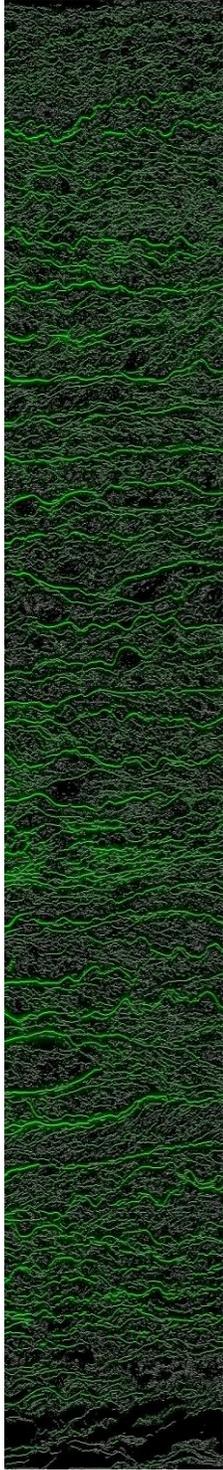


Figura: 23. Contagem de fibras por análise computacional conta, simultaneamente, fibras e lamelas elásticas. As lamelas fazem a conexão entre uma fibra e outra.

5.0 Discussão

A possibilidade de realizar um trabalho interdisciplinar (Instituto de Física, Computação e Ciências Médicas) permitiu a criação de uma metodologia para análise de fibras elásticas da aorta.

A quantificação das alterações morfológicas pode ser feita por análise humana e computadorizada da textura (Cia et al.,1999; Irazusta et al., 1998; Metze et al., 1999; Metze et al., 1999; Lorand-metze et al., 1998; Oliveira et al., 2001; Mello et al., 2008; Adam et al., 2008; Herreros et al., 2007; Auada et al., 2006; Rocha et al., 2008; Rocha et al., 2006; Adam et al., 2006; Kayser et al., 2007, Prado 2008). No entanto, a análise computacional tem a vantagem em relação à humana, porque permite a visualização de estruturas que passam despercebidas ou não são notáveis ao olho humano (Metze, 1999), além disso, independe da subjetividade humana. Os parâmetros de análise de imagem podem ser usados com vantagem de estimar pequenas mudanças que não são óbvias ao olho humano, invisíveis, ou difíceis de incluir numa descrição qualitativa (Adam, 2002). O interesse em usar processamento digital de imagens tem o objetivo de aprimorar a imagem para a interpretação humana. (Metze,1999)

Novas tecnologias em aquisições de imagens disponíveis no mercado permitiram o uso de análise quantitativa de tecidos. (Kayser, 2006- Goertler, 2006). A utilização da microscopia a laser foi um grande avanço para pesquisa biomédica, a resolução necessária para observar processos mecânicos e bioquímicos em nível celular requer ferramentas fotônicas (Thomaz, 2007)

Dentro deste novo contexto, a entropia foi aplicada com sucesso na análise de imagens de diferentes tecidos tanto para o diagnóstico diferencial como para o prognóstico (Kayser, 2007)

Diversos trabalhos foram realizados aplicando a entropia na análise morfológica de casos com difíceis diagnósticos. (Adam e col 2004), utilizaram a

entropia da matriz de co-ocorrência de Haralick para diferenciar quelóides e cicatrizes hipertróficas. Komitowski e col 1993 observaram que o tamanho dos aglomerados de cromatina condensada em células neoplásicas do útero é um fator prognóstico desfavorável, e o pesquisador defende que a entropia, como medida para a desorganização do genoma celular durante a neoplasia, parece ser um bom parâmetro para análise do prognóstico.

O presente método, (aquisição de imagens por microscopia a laser, reconstrução das imagens através do *Cell Sociology*, análise da imagem total (mosaico) utilizando *gliding box* para cálculo de entropia e homogeneidade local extraídas de Matriz de co-ocorrência de Haralick e contagem de fibras pelo programa *Layer*), é uma ferramenta que permite uma análise objetiva da textura de fibras elásticas da aorta com a possibilidade de quantificar processos patológicos

Na literatura podem-se encontrar estudos utilizando Entropia em conjunto com homogeneidade Local (que também é extraída a partir da matriz de co-ocorrência de haralick). Prado (2008) analisou área dos núcleos dos túbulos contorcidos proximais renal de ratos intoxicados por chumbo a partir da entropia e da homogeneidade local de haralick e observou que houve importantes alterações ultra-estruturais do citoplasma, a partir do oitavo dia de intoxicação. Metze e col (2008) estudaram a textura da cromatina de adenomas foliculares e de nódulos tireoidianos utilizando entropia e homogeneidade local. Os autores observaram que a textura nuclear de pequenos adenomas é parecida com as dos nódulos hiperplásicos e a textura de adenomas maiores é semelhante à de carcinomas invasivos. Mello et al (2007), utilizando a entropia e homogeneidade local observaram diferenças significativas no padrão da textura nuclear de diferentes fenótipos da Leucemia Linfóide Aguda, tanto as originadas de células B como as da células T.

As características texturais foram analisadas com base nos níveis de cinza da imagem.

No presente trabalho utilizamos entropia em conjunto com homogeneidade local para analisar a estruturas das fibras elásticas na aorta ascendente.

Nas aortas dos pacientes normotensos, houve um aumento do desvio padrão (correspondente a variação topográfica) das fibras fluorescentes com o aumento da idade, porém o número médio de fibras permanece constante. Gallagher (, 1997) descreveu que a estrutura normal dos vasos sofre alterações progressivas durante toda a vida. Este fato sugere, simultaneamente, perdas e ganhos locais. Sans e Moragas (1993) observaram que em pacientes normotensos ocorre uma pequena fragmentação de fibras elásticas.

Observamos discretos distúrbios da arquitetura da aorta, do grupo dos normotensos, na transição do terço interior para o terço médio, pensamos que podem ser decorrentes de problemas de vascularização local.

O suprimento da aorta com oxigênio ocorre de duas formas: por difusão de oxigênio a partir do lúmen da aorta e por irrigação sanguínea via vasos vasorum a partir da adventícia nos dois terços externos. Angouras et al. (2000;) em trabalho realizado com aortas de suínos observaram que a camada média neste local, é a primeira a sofrer privação de irrigação em situações de alterações do fluxo sanguíneo. Portanto os autores sugeriram que estas áreas pudessem ser as mais propensas a sofrerem alterações arquiteturais.

Nakashima e col (1990) contaram em pacientes normotensos adultos uma média 55 a 65 fibras por aorta. Junqueira e Carneiro (1995) mencionam 70 camadas de fibras elásticas por aorta em adultos. A de contagem de fibras no trabalho de Nakashima e col (1990), foi feita pelo observador humano a partir de imagens adquiridas em microscopia eletrônica. Junqueira não menciona a metodologia utilizada.

No nosso trabalho a média de fibras calculadas em pacientes normotensos foi de 120 fibras por aorta, a contagem destas fibras foi realizada por análise computacional.

Na aorta existem lamelas entre as fibras elásticas conectando-as. (Junqueira e Carneiro, 1997). O programa usado por nós conta simultaneamente ambas às fibras.

Foi observado que nas aortas de pacientes hipertensos há m aumento da distância entre as fibras elásticas. Este dado também foi encontrado num trabalho realizado por Sans e Moragas (1992) e eles atribuem este fato como o responsável pelo aumento da circunferência da aorta em hipertensos.

Sugerimos que o aumento das distancias das fibras elásticas em pacientes hipertensos possa ser relacionado com a hipertrofia da musculatura lisa e o aumento da substância fundamental em hipertensos.

No grupo dos hipertensos observamos que há um aumento do desvio padrão do número de fibras elásticas com a idade, o que sugerea ação de processos adaptativos e degenerativo simultaneamente. Nakashima e col1990 observaram que 10 em 14 pacientes hipertensos apresentaram aumento de fibras elásticas interlamelares, ou seja, pequenas fibras que fazem conexão entre uma fibra elástica e outra. Estudos realizados anteriormente com camundongos hipertensos, mostraram que a hipertensão induz um aumento significativo das fibras elasticas. (Wolinsky, 1972; Wolinsky 1973; Olivetti e col 1980)

Porém em nosso estudo não houve aumento significativo de fibras elásticas em hipertensos. Ocorreu apenas um aumento do desvio padrão, que sugere perdas e ganhos das fibras em áreas vizinhas.

Como possíveis causas desta discrepância, sugerimos:

-
1. Diferentes níveis de intensidade de hipertensão entre nossos pacientes e os pacientes do estudo de Nakashima et al.
 2. Diferentes faixas de idade.
 3. Em casos graves de hipertensão é possível que haja ganhos de fibras elásticas compensando a perda.

5.1 Limitações do estudo

Uma das dificuldades de se estudar materiais de autópsias é conseguir parear idades entre pacientes normotensos e hipertensos. Este limitou nosso número de indivíduos em de cada grupo. Além disso, existem dificuldades de encontrar pacientes normotensos a partir da sexta década de vida; em nosso grupo de normotenso o paciente mais idoso tem 60 anos, enquanto no grupo dos hipertensos o mais idoso tem 78 anos.

Não foi possível medir os diâmetros das aortas. Como foi relatado anteriormente, o material utilizado neste trabalho eram blocos pertence ao arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, e muitos destes blocos tinham apenas uma parte do anel da aorta, não sendo possível assim fazer a medição.

Cinco pacientes foram excluídos deste trabalho por que os dados dos relatórios de autópsia ou prontuários médico estavam incompletos, não sendo possível classificá-los como normotensos ou hipertensos. As informações incompletas ou não registradas nestes documentos são grandes empecilhos para pesquisas quando se é necessário buscar dados clínicos dos pacientes.

O prosseguimento de estudos, utilizando o presente método, com número maior de paciente tanto nos grupos dos pacientes normotensos como hipertensos é de fundamental importância. Porém, parear faixas etárias em

grupos grandes, principalmente na idade avançada, é um desafio quando se trabalha com material de autópsia.

6.0 Conclusão

O presente método é uma ferramenta que permite uma análise objetiva da textura de fibras elásticas da aorta com a possibilidade de quantificar processos patológicos.

Nos pacientes normotensos:

- Número de camadas de fibras elásticas em adultos é independente da idade;
- Existem discretos distúrbios da arquitetura na transição do terço interior para o terço médio.

Nos pacientes hipertensos:

- Há aumento da distância entre as fibras elástica com o envelhecimento;
- Aumento do desvio padrão do número de fibras com o envelhecimento

7.0 Referências Bibliográficas

Adam RL, Corsini TCG, Silva PV, Cintra ML, Leite NJ, Metze K: Fractal dimensions applied to thick contour detection and residues - Comparison of keloids and hypertrophic scars. *Cytometry A* 2004; 59A : 63-64

Adam, RL Análise espectral usando a Transformada de Fourier Discreta para o estudo de núcleos celulares: Elaboração de Programa e aplicação no desenvolvimento do coração. (Dissertação – Mestrado) Campinas, SP – Universidade Estadual de Campinas, 2002.

Adam, RL; Leite, NJ; Metze, K. Image Preprocessing Improves Fourier-Based Texture Analysis of Nuclear Chromatin. *Anal Quant Cytol Histol* 2008;30: 175 – 184.

Adam, RL; Silva, RC; Pereira, FG; Leite NJ; Lorande-metze I; Metze K. The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol* 2006; 28: 55-59.

Angouras D; Sokolis DP, Dosios, Kostomitsopoulos, Boudoulas H, Skalkeas, Karaynnacos PE. Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 17 (2000) 468-473.

Auada, MP; Adam, RL; Leite, NJ; Puzzi, MB; Cintra, ML; Rizzo, WB et al Texture analysis of the epidermis based on fast Fourier transformation in Sjögren-Larsson syndrome. *Anal Quant Cytol Histol* 2006;28: 219-227.

Benetos A, Waeber B, Izzo J, Mitchell G, Resnick L, Asmar R, Safar M. Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications. *Am J Hypertens.* 2002;15:1101-1108.

Berry CL, Greenwald SE, Rivett JF. Static mechanical properties of the developing and mature rat aorta. *Cardiovasc Res* 1975;9(5):669-78.

Borges LF, Jaldin RG, Dias RR, Stolf NAG, Michel JB, Gutierrez PS. Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta. *Human Pathology* (2008) 39, 437-443.

Carvalho HF de, Taboga SR Fluorescence and confocal laser scanning microscopy imaging of elastic fiber in hematoxylin- eosin stained sections. *Histochem Cell Biol* (1996) 106:587-592

Choudhury, N; Bouchot, O; Rouleau, L; Tremblay, D; Cartie, R; Butany, R; Mongrain, R; Leask, RL. Local mechanical and structural properties of healthy and diseased human ascending aorta tissue. *Card Path*: 2209; 18: 83-91.

Cia, EMM; Trevisan, M; Metze, K. Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) technique: a helpful tool for differential diagnosis in urinary cytology. *Cytopathology* 1999;10: 30-39.

Fievez M. Aneurysms and arterial dissection. *Diseases of the arterial wal*. Springer-Verly 534-542.

Gallagher PJ. Cap 33 Blood Vessels. *Histology for Pathologists*. 2 ed. Ed Philadelphia, 2007.

Goertler J, Berghoff M, Kayser G, Kayser K: Grid technology in tissue-based diagnosis: fundamentals and potential developments. *Diagn Pathol* 2006. 1:23.

Hagan PG, Nienaber CA, Isselbacher EM, et al. The international registry of acute aortic dissection (IRAD): news insights into an old disease. *JAMA*. 2000;283:897-90.

Halloran BG, Davis VA, McManus BM, Lynch TG, Baxter BT. Localization of aortic dissection is associated with intrinsic differences in aortic structure. *J Surg Res* 1995;59(1): 17-22.

Haralick, RM; Shanmugan, K; Dinstein, I. Texture features for image classification. IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics 1973;3: 610-21.

Herreros, FO; Cintra, ML; Adam, RL, de Moraes, AM; Metze, K. Remodeling of the human dermis after application of salicylate silanol. Arch Dermatol Res 2007;299: 41-45

Irazusta, SP; Vassalo, J; Magna, LA; Metze K; Trevisan, M. The value of PCNA and AgNOR staining in endoscopic biopsies of gastric mucosa. Pathology Research and Practice 1998; 194: 33-39.

Junqueira L. C. & Carneiro J. 1995. Histologia Básica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4 edição.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1974.

Kayser G, Gerlach U, Walch A, Nitschke R, Haxelmans S, Kayser K, Hopt U, Werner M, Lassmann S: Numerical and structural centrosome aberrations are an early and stable event in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal carcinomas. Virchows Arch 2005; 447:61-65

Kayser K, Baumhäkel JD, Gabius HJ: The biological importance of structural thermodynamics and ligand properties in lung cancer. Abstract: 6th ESACP Congress 1999, Heidelberg, April 7 – 11,

Kayser K, Molnar B, Weinstein RS: Virtual microscopy – Fundamentals, Applications, Perspectives of electronic tissue – based diagnosis. Berlin, VSV Interdisciplinary Medical Publishing, 2007

Kayser K, Szymas J, Weinstein RS: Telepathology and Telemedicine. Berlin, VSV Interdisciplinary Medical Publishing, 2006

Kayser K: Introducing diagnostic pathology. Diagn Pathol 2006; 1:1.

Kayser, K; Kayser, G; Metze, K. The concept of structural entropy in tissue-based diagnosis. *Anal Quant Cytol Histol* 2007; 29: 296-308.

Komitowski DD, Hart MM, Janson CP: Chromatin organization and breast cancer prognosis: Two-dimensional and three-dimensional image analysis. *Cancer* 1993; 72:1239-1246

Koning K, Laser tweezers and multiphoton microscopes in life sciences. *Histochem Cell Biol*(114)2001;114:79-92.

Larson EW, Edwards WD. Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. *Am J Cardiol.* 1984;53:849-855.

Lorand-Metze, I; Carvalho, MA; Metze, K., Relationship between morphometric analysis of nucleolar organizer regions and cell proliferation in acute leukemias. *Cytometry* 1998;32: 51-56.

Lu Q, Ganesan K, Simionescu DT, Vyavahare NR. Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 2004;25:5227-5237.

Matos M, Raby BN, Zahm JM, Polette M, Birembaut P, Bonnet N. Cell migration and proliferation are not discriminatory factors in the vitro sociologic behavior of bronchial epithelial cell lines. *Cell Motil Cytoskeleton.*2002;53:53-65.

Mattos, AC. Alterações semelhantes à displasia fibromuscular (SDFM) em vasos mesentéricos: um fenômeno de remodelamento? (Dissertação – Mestrado) Campinas, SP – Universidade Estadual de Campinas, 2001.

Mecham RP, Broekelmann T, Davis EC, et al. Elastic fibreassembly: macromolecular interactions. In: *The molecular biology and pathology of elastic tissues* (Ciba Foundation Symposium 192). Wiley, Chichester, 1995, p 172-184.

Mecham RP, Davis EC. Elastic fiber structure and assembly. In: Extracellular matrix assembly and structure, Yurchenko PD, Birk DE, Mecham RP (eds). Academic press, San Diego, 1994, p 281-314

Mello M, Metze K, Adam R, Pereira F, Magalhães M, Lorand-Metze I. Phenotypic Subtypes OF Acute Lymphoblast Leukemia Associated with Different Nuclear Chromatin Texture. *Anal Quant Cytol Histol* 2007;29:1-7.

Mello, MRB; Metze, K; ADAM, RL; Pereira, FG; Magalhães, MG; Machado, CG et al. Phenotypic Subtypes of Acute Lymphoblastic Leukemia Associated with Different Nuclear Chromatin. Texture. *Anal Quant Cytol Histol* 2008;30: 92-98.

Metz HL. Microscópio confocal. Instituto de Física Gleb Wataghn. Universidade Estadual de Campinas.

Metze K, Silva PVVT, Adam RL, Cintra ML, Leite NJ : Differentiation of keloid and hypertrophic scar by texture analysis. *Anal Cell Pathol* 2002;24:196

Metze, K; Adam, RL. Quantification in histopathology - some pitfalls. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2005;38: 141-3.

Metze, K; Adam, RL; Silva, PV; Carvalho, RB; Leite, NJ. Analysis of chromatin texture by pinkus' approximate entropy. *Cytometry* 2004;59(1): 63

Metze, K; Bedin, V; Adam, RL, Cintra, ML; Souza, EM; Leite, NJ. Parameters derived from the Fast Fourier Transform are predicitive for the recurrence of basal cell carcinoma. *Cellular Oncology* 2005a; 27: 137.

Metze, K; Chiari, AC; Andrade, FL; Lorand-Metze, I. . Changes in AgNOR configurations during the evolution and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hemato Cell Ther* 1999;41: 205-210.

Nakashima, Y; Shiokawa, Y; Sueishi K. Alterations of Elastic Architecture in Human Aortic Dissecting Aneurysm. In: the United States and Canadian Academy of Pathology. Vol. 62, N.6, p, 751, 1990.

Oliveira, GB; Pereira, FG; Metze, K; Lorand-Metze, I. Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and its relationship to clinical and cell kinetic parameters. *Cytometry* 2001;46: 329-335.

Olivetti G, Anversa P, Mellisari M, Loud AV. Morphometry of medial hypertrophy in the thoracic aorta. *Lab Invest* 42:559-565,1980.

Om A, Porter T, Mohanty PK. Transesophageal echocardiographic diagnosis of acute aortic dissection complicating cocaine abuse. *Am Heart J.* 1992; 123(2):532-534.

Prado, CM; Ramos, SG; Alves-Filho, JCF; Elias, J Jr; Cunha, FQ; Marcos A. Turbulent flow/low wall shear stress and stretch differentially affect aorta remodeling in rats. *Journal of Hipertension*: 2006; 24-3: 503-515.

Prado, GLP Estudo da Textura Nuclear em Ratos Winstar Intoxicados por Chumbo. (Dissertação – Mestrado) Campinas, SP – Universidade Estadual de Campinas, 2008.

Roberts WC. Aortic dissection: anatomy, consequences, and causes. *Am Heart J.* 1981;101:195-214.

Rocha, LB; Adam, RL; Leite, NJ; Metze, K; Rossi, MA. Biomineralization of polyanionic collagen-elastin matrices during calvarial bone repair. *J Biomed Mater Res A* 2006;79: 237-245.

Rocha, LB; Adam, RL; Leite, NJ; Metze, K; Rossi, MA. Shannon's entropy and fractal dimension provide an objective account of bone tissue organization during calvarial bone regeneration. *Microsc Res Tech*, 2008.

Sans M; Moragas A. *Analy and Quant Cytology and Cytology*.p 93-100,

Silver FH; Christiansen DL, Buntin CM. Mechanical properties of the aorta: a review. Crit Rev Biomed Eng 1989; 17(4) : 323-58.

Sudbo J, Bankfalv A, Bryne M, Marcelpoil R, Boysen M, Piffko J, Hemmer J, Kraft K, Reith A. Prognostic value of graph theory-based tissue architecture analysis in carcinomas of the tongue. Lab Invest. 2000;80(12): 1881-9.

Theodridis, S; Koutroumbas, K. Pattern Recognition. 3. ed. USA: Elsevier, 2006. p. 837

Thomaz, AA; Fustino, WM; Fontes, A; Fernandes, H.P; Barjas-Castro, M d L, Mezte, K; Giorgio, S; Barbosa, LC; Cesar, CL. Optical tweezers and multiphoton microscopies integrated photonic tool for mechanical and biochemical cell process studies. Proceedings of the SPIE, 2007 vol 44, pp 66440H.

Thomaz, AAC. Ferramentas Biofotônica integrada para manipulação e microscopias confocais. (Dissertação – Mestrado) Campinas, SP – Universidade Estadual de Campinas, 2007

Van De Wouwer G, Wenyn B, Scheunders P, Jacob W, Van Marck E, Van Dyck D: Wavelets as chromatin texture descriptors for the automated identification of neoplastic nuclei. J Microscopy 2000;197:25-35.

Virmani R. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of Hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. Am J Pathol. 199;139(5): 1119-29.

Wolinsky H: Comparative effects of castration and Antiandrogen treatment on the aortas of hypertensive and normotensive male rats. Circ Res 33:183-189,1973.

Wolinsky H: Long term effects of hypertension on the rat aortic wall and their relation to concurrent aging changes. Circ Res 30:301-309,1972.