

Morfometria nuclear como técnica complementar na graduação citológica do carcinoma de mama

Nuclear morphometry with complementary technique in cytological grading of breast tumors cells

Sandra Regina Bariani¹, Mizue Imoto Egami², Célia Regina de Souza Bezerra Sakano³, Thiago Simão Gomes¹, Henrique Costa⁴,
Celina Tizuko Fujiyama Oshima¹

Resumo

Introdução: A análise morfométrica dos parâmetros nucleares, tamanho, forma e aspectos da cromatina, mostra-se útil para diagnosticar tumores malignos. O aspirado citológico coletado por agulha fina produz esfregaços suficientemente delgados para a determinação de dimensões nucleares facilmente. **Objetivo:** Comparar os aspectos morfométricos dos núcleos das células do aspirado proveniente de nódulos de mama. **Método:** Esfregaços do aspirado provenientes de 71 biópsias de nódulos de mama e determinados como benignos ou malignos, coletados por agulha fina, foram submetidos à coloração de Feulgen e as suas imagens digitais analisadas utilizando-se a Imagilab[®] 2,3 (Softium Informatica Ltda.), ambientado no sistema operacional Windows[™] 98 SE. **Resultados:** Dentre os nódulos estudados, 20 foram diagnosticados como benignos e 51 como malignos (8 GI, 23 GII e 20 GIII de acordo com o Sistema de Classificação de Guilford e Robinson). A análise morfométrica da coloração de Feulgen determinou um valor médio para os nódulos benignos de 101,6 e valor médio de 114,3 para os nódulos malignos, respectivamente. A análise morfométrica da coloração de Papanicolaou determinou um valor médio de 103,5 para GI, 131,7 para GII e 98,4 para GIII, respectivamente. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre o valor médio morfométrico de nódulos benignos e malignos e valor médio entre GI e GII, GII e GIII, mas não entre GI e GIII. **Conclusões:** A análise morfométrica nuclear dos aspirados de nódulo de mama é um método simples, confiável e complementar, que permitiu distinguir as lesões benignas das lesões malignas da mama.

Palavras-chave: Radiometria/métodos; neoplasias da mama; técnicas citológicas.

Abstract

Introduction: The morphometrical analysis of nuclear parameters, such as size, shape and chromatin features, has shown to be useful for diagnosing malignant tumors. Cytological aspirate collected with fine needle, in turn, provides smears thin enough for easily determining nuclear dimensions. **Objective:** Compare morphometrical features of cell nuclei in aspirate from breast nodules. **Method:** Fine needle aspiration smears from 71 breast nodules were analyzed and determined as benign or malignant. They were then Feulgen-stained and had their digital images analyzed using the Imagilab[®] software package (Softium Informatica Ltda.) run on Windows[™] 98SE. **Results:** Among the nodules studied, 20 were diagnosed as benign and 51 as malignant (8 GI, 23 GII and 20 GIII according to Guilford and Robinson Classification System). The morphometrical analysis of the Feulgen-stained material digital images determined an average value for benign nodules of 101.6 and an average value of 114.3 for malignant nodules. The Papanicolaou stain morphometrical analysis determined an average value of 103.5 for GI, 131.7 for GII and 98.4 for GIII. There was a statistically significant difference between the morphometrical average values for benign and malignant nodules, and between GI and GII, and GII and GIII, but not GI and GIII average values. **Conclusion:** The nuclear morphometry of breast nodule aspirate is a simple, reliable and complementary method that allowed distinguishing benign from malignant injuries of the breast.

Keywords: Radiometry/methods; breast neoplasms; cytological techniques.

Recebido: 10/1/2010

Revisado: 23/8/2010

Aprovado: 14/10/2010

Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Molecular do Departamento de Patologia. Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo (SP), Brasil

¹ Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo (SP), Brasil

² Departamento de Histologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo (SP), Brasil

³ Departamento de Ginecologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo (SP), Brasil

⁴ Faculdade de Medicina da Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas (Uncisal), Maceió (AL), Brasil.

Endereço para correspondência: Thiago Simão Gomes – Rua Pedro de Toledo, 781 – CEP: 04039-032 – São Paulo (SP), Brasil – Telefone: (11) 6158-5703 – e-mail: simao112@gmail.com

Introdução

Métodos para mensurar objetos microscópicos vêm sendo desenvolvidos desde o século XVII. Um dos pioneiros foi Antonie van Leeuwenhoek, que pesquisou como referência grãos de areia e fios de cabelos de diferentes tamanhos e descobriu que o eritrócito humano era 25 mil vezes menor do que um grão de areia pequeno, correspondendo a $8,5 \mu\text{m}^1$.

Em patologia, a análise de imagem é vista como um método auxiliar que serve como apoio à resolução de problemas difíceis. Muitos critérios histomorfométricos têm sido propostos como indicadores de prognóstico e tratamento. Entre eles, podemos citar a morfometria nuclear²⁻⁶, a textura nuclear⁴, a morfometria nucleolar⁷ e o índice mitótico obtido por meio de morfometria computadorizada⁵ que se mostraram, por si só ou em conjunto, valiosos indicadores de prognóstico para o carcinoma ductal *in situ* de mama (CDIS).

A morfometria nuclear tem demonstrado sua utilidade no diagnóstico diferencial, avaliando alguns parâmetros do núcleo como tamanho, forma e padrão cromatínico. Nas células tumorais, essas características são sabidamente diferentes daquelas observadas nas não-tumorais.

A primeira etapa na morfometria é a escolha principalmente da amostragem, seguida da segmentação e a medida da textura da cromatina. A análise da textura da cromatina é matematicamente complexa. Uma classificação pode ser obtida baseada em algoritmos aplicados a múltiplos descritores de células tumorais como tamanho nuclear, textura da cromatina, forma, entre outros, e as melhores aproximações dessa classificação seriam a análise multivariada e a regressão logística. O fator limitante em toda rotina de aplicação da análise de imagem é provavelmente a ausência de um segmentador nuclear automático confiável.

Os aspirados citológicos permitem realizar esfregaços citológicos delgados que facilitam a mensuração nuclear, observar a evolução do diâmetro nuclear, talvez de forma mais simples, rápida e precisa quando comparada às secções histológicas e, ainda, estabelecer diferenças entre o diâmetro nuclear encontrado em doenças benignas e malignas, corroborando o diagnóstico diferencial⁸.

A análise citológica dos aspirados por agulha fina corados pela técnica de Papanicolaou tornou-se popular pela rapidez e precisão na obtenção do diagnóstico de câncer de mama⁹. Houve um incremento no número de artigos citando a clareza na diferenciação da graduação de baixa e alta malignidade no carcinoma de mama, devido à facilidade na observação e análise de parâmetros como diâmetro e pleomorfismo nuclear, e presença de nucléolo^{10,11}.

Por outro lado, estudos citológicos indicam que o método de Feulgen, que é procedimento histoquímico específico para identificação de DNA dos núcleos das células obtidas em esfregaços de carcinoma de mama, determina com eficácia o índice de mitose e a distribuição da cromatina. Apresenta, também, eficácia na avaliação do grau de con-

densação da cromatina, importante na discriminação da transformação celular, facilitando a determinação do estágio citológico^{12,13}.

O método de Feulgen baseia-se na hidrólise do DNA pelo ácido clorídrico, que promove a retirada das bases púricas com a formação de grupamentos aldeídicos na desoxirribose. O DNA com radicais aldeídos livres, por sua vez, quando em presença do reativo de Schiff, forma composto insolúvel de cor magenta, sendo a intensidade de cor diretamente proporcional à quantidade de DNA^{14,15}.

Os métodos de Papanicolaou¹⁶ e de Feulgen¹⁵ foram considerados complementares por Davey *et al.* após estudo citológico de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de carcinoma de mama¹⁷.

O presente estudo teve como objetivo apresentar os resultados da morfometria nuclear aplicando-se os métodos de Papanicolaou¹⁶ e de Feulgen¹⁵ em esfregaços obtidos de PAAF ou do raspado citológico de fragmento de nódulo de mama obtido por *core biopsy*.

Método

Foram utilizados 71 esfregaços obtidos de PAAF e/ou raspados de nódulo de mama de 71 pacientes atendidas e tratadas na Disciplina de Mastologia do Departamento de Ginecologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), no período entre 2001 e 2004. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Paulista de Medicina da Unifesp, processo nº 0658/04.

Mulheres grávidas, mulheres com carcinoma ductal *in situ*, aquelas que realizaram tratamento prévio para carcinoma de mama (quimioterapia, radioterapia ou hormonioterapia) ou que se submeteram a procedimentos cirúrgicos prévios foram excluídas do estudo.

Pacientes cuja avaliação clínica e radiológica indicou a presença de nódulo suspeito para carcinoma de mama foram selecionadas e submetidas à avaliação citológica por meio de PAAF ou biópsia de fragmento com raspado citológico, para elucidar a ocorrência ou não de células neoplásicas malignas, coradas pelo método de Papanicolaou. Lâminas com material citológico e não-coradas foram obtidas concomitantemente e reservadas para serem coradas pelo método de Feulgen.

Nos casos em que o material oriundo da PAAF se mostrou inadequado, as pacientes foram submetidas à biópsia de fragmento. Dos fragmentos obtidos, foram realizados raspados citológicos com lâmina de bisturi número 21, sendo estendidos em lâmina de vidro e fixados em álcool 96%.

Quando a avaliação citológica foi positiva para células neoplásicas malignas, realizou-se biópsia cirúrgica convencional diretamente dos nódulos, e os fragmentos obtidos foram fixados em formalina tamponada 10% e incluídos em parafina. Dos blocos de parafina, foram obtidos cortes com 3 mm de espessura e uma lâmina de cada bloco foi corada pelo método de hematoxilina-eosina para diagnóstico histopatológico no Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina da Unifesp.

O Sistema de Classificação de Guilford e Robinson (SCRG) foi utilizado para avaliação citológica qualitativa nas lâminas coradas pela

técnica de Papanicolaou. Foi considerada toda extensão dos esfregaços, percorridos em varredura vertical, utilizando-se microscópio marca Olympus, ocular de 10X, acoplado a uma objetiva de 40X, com aumento final de 400X. Os resultados dessa análise foram comparados com os dos laudos histopatológicos.

Para avaliação morfométrica quantitativa, lâminas coradas pelo método de Feulgen foram analisadas pelo sistema computadorizado de análise digital de imagem Imagilab® 2.3, Softium Informática Ltda., ambientado no sistema operacional Windows® 98 SE. Utilizou-se microscópio Nikon®, acoplado a videocâmera Sony® colorida modelo SSC-DC 54 (Digital Hiper Had) que, ao captar a imagem por meio do programa de videocaptura (VIDCAP 32®), transferiu-a para o *software* Imagilab®. Utilizou-se microcomputador Intel (Pentium II), processador de 350 MHz, 64 Mb de memória RAM com placa digitalizadora e o aumento final de 1.000 vezes.

Após seleção dos campos de melhor representatividade, sem sobreposição, iniciou-se a marcação de, no mínimo, cem imagens da região correspondente ao DNA nuclear, quando, automaticamente, o programa VIDCAP32® forneceu uma tabela de dados numéricos, em unidade pixel, referentes à densidade de cor emitida por cada item-ima-

gem de DNA assinalada. Os esfregaços citológicos foram analisados em varredura vertical e de modo sequencial.

Como controle de qualidade, valores da densidade de cor dos casos negativos foram comparados àqueles dos casos positivos. Uma mesma calibração padrão de intensidade de cor foi aplicada a todas as imagens analisadas.

O teste *t* de Student foi utilizado para comparar os valores das densidades de cor obtidos pelo método de Feulgen, entre os grupos de pacientes com diagnóstico positivo e negativo para células neoplásicas malignas e para pacientes com diagnóstico positivo para malignidade, segundo classificação histológica.

A análise de variância (ANOVA) serviu para comparar os valores encontrados nos três grupos de graduação citológica positiva. Como as variâncias não eram homogêneas, empregou-se o teste Brown-Forsythe. Ao serem constatadas diferenças significantes, foi empregado o teste de Dunnett para identificar o grupo diferenciado (comparações múltiplas dois a dois). O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

Resultados

Das 71 pacientes selecionadas, 20 (28,2%) apresentaram esfregaços citológicos negativos e 51 (71,8%) positivos para células neoplásicas malignas segundo SCGR. As amostras de todas as pacientes foram submetidas à confirmação diagnóstica pelo estudo anatomopatológico dos nódulos. Os esfregaços positivos para células neoplásicas malignas, corados pelo método de Papanicolaou e classificados segundo SGGR, mostraram que 8 pertenciam ao grau I, 23 ao grau II e 20 ao grau III.

As características morfológicas das lâminas coradas pelo Papanicolaou e sua classificação segundo a graduação SCGR estão mostradas na Figura 1, observando-se, nos casos negativos, coesão celular, basofilia citoplasmática e uniformidade no tamanho, forma e limite nuclear, enquanto nos casos com graduações I, II e III, são evidentes a falta de coesão celular e a uniformidade nuclear, aspectos que se intensificam conforme o grau de malignidade. Na Figura 2, esfregaço negativo para células neoplásicas malignas corado pelo Feulgen apresenta em magenta o DNA da cromatina de células uniformemente compactadas e homogeneidade na distribuição e intensidade de cor do DNA. Esfregaço positivo para células neoplásicas apresenta a distribuição, grau de compactação e intensidade de cor do DNA da cromatina heterogênea.

A análise morfométrica quantitativa computadorizada (AMQC) pelo método de Feulgen mostrou valor médio para os esfregaços citológicos negativos de 101,6 e para os positivos de 114,3 (Tabela I). A Tabela II apresenta o resultado da AMQC utilizando o método de Feulgen em relação aos índices do SGGR. O teste de comparação múltipla (GI x GII, GI x GIII e GII x GIII) mostrou valores significativamente maiores para GII em relação a GI e GIII ($p < 0,05$).

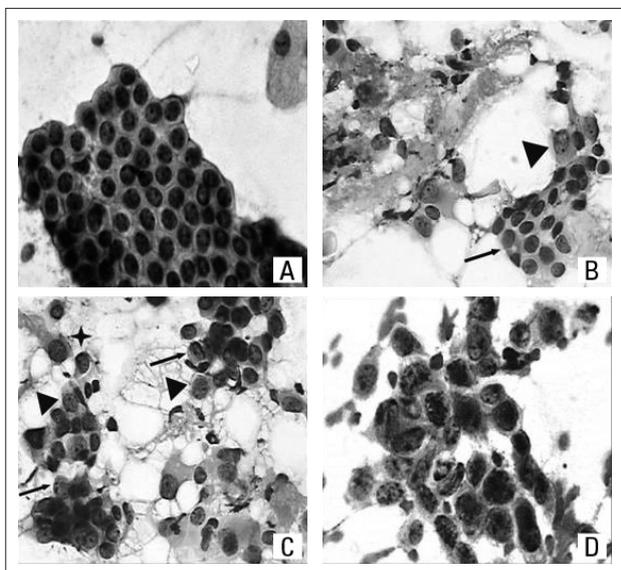


Figura 1 – Paineis de fotomicrografias dos esfregaços citológicos de mama obtidos por PAAF ou raspados citológicos, positivos e negativos para células neoplásicas malignas, coradas pelo método de Papanicolaou. Em A, caso negativo para células neoplásicas malignas, no qual ressaltam características morfológicas importantes como a coesão celular, basofilia citoplasmática e uniformidade no tamanho, forma e margem nuclear. Em B, observar a preservação parcial da coesão celular e da uniformidade na forma, tamanho e margem dos núcleos (seta). Cromatina nuclear do tipo vesicular (cabeça de seta) – graduação GI. Em C, notar as células isoladas (estrela) e agrupadas (seta), cromatina nuclear do tipo granular (cabeça de seta) e heterogeneidade na forma e tamanho dos núcleos – graduação GII. Em D, observar ausência de coesão celular, cromatina nuclear de condensação heterogênea intensa, variação na forma e tamanho dos núcleos – graduação GIII. Papanicolaou, 640x.

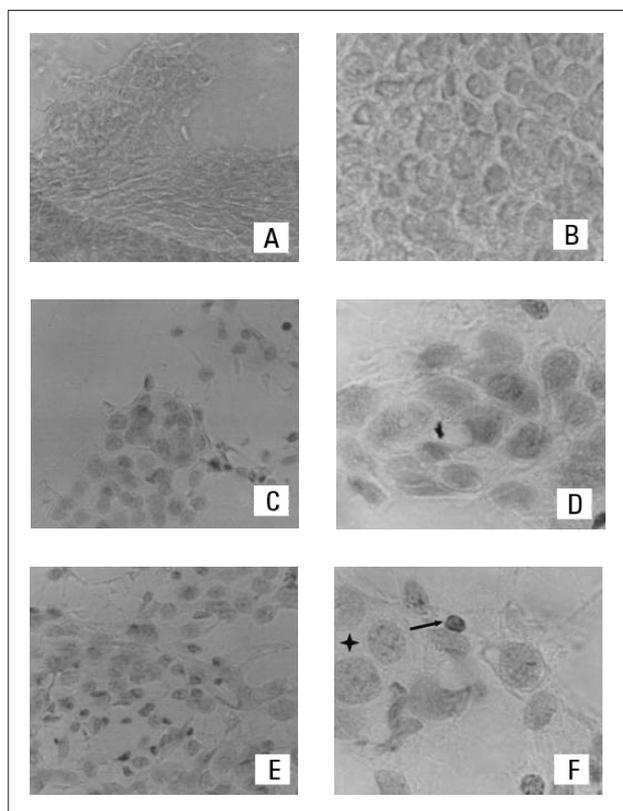


Figura 2 – Painel de fotomicrografias dos esfregaços citológicos de mama obtidos por PAAF ou raspado citológico. Em 2A e B, amostras negativas para células neoplásicas. Observar em magenta o DNA da cromatina de células uniformemente compactadas (2A) 640x e homogeneidade na distribuição e intensidade de cor do DNA (2B) 1600x. Em 2C, D, E, e F casos positivos para células neoplásicas. Observar em magenta a distribuição irregular e homogeneidade no grau de compactação do DNA da cromatina (2C) e intensidade de cor heterogênea do DNA da cromatina (2D) 640x. Ausência de coesão celular e distanciamento do DNA nuclear (2E) e, em magenta, a irregularidade na distribuição do DNA, compactado de forte intensidade de cor (seta) e frouxo de fraca intensidade (estrela) (2F). Feulgen, 1600x.

Discussão

No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres. O exame clínico da mama e a mamografia devem ser realizados anualmente após os 40 anos de idade, e sua sensibilidade aumenta após os 50 anos, exceto para mulheres de alto risco, cujo rastreamento deverá ser individualizado. Esses exames são essenciais para o diagnóstico, tratamento eficaz e menos agressivo, e possível cura do câncer de mama¹⁸.

A citologia mamária é um método de complementação diagnóstica importante no diagnóstico precoce dos nódulos mamários. A citologia de amostras colhidas por meio da PAAF ou *core biopsy* são realizadas quando há um nódulo palpável da mama. Caso a PAAF não mostre uma resposta definitiva, é realizada uma biópsia de fragmento com uma agulha de calibre um pouco mais grosso que na PAAF. Esse é um método realizado com a paciente em visita ambulatorial, quando o citopatologista poderá, em alguns minutos, determinar se a amostra

Tabela I – Resultado da morfometria nuclear computadorizada da densidade de cor do DNA dos esfregaços citológicos positivos e negativos para células neoplásicas malignas utilizando-se o método de Feulgen

AMQC	Grupo	
	Negativo	Positivo
Média	101,6	114,3
Mediana	101,5	108,0
Desvio padrão	0,3	20,1
Mínimo	101,3	76,7
Máximo	102,2	157,5

AMQC: análise morfométrica quantitativa computadorizada.

Unidade: pixel.

Teste *t* de Student, $p < 0,05$.

Tabela II – Resultado da morfometria nuclear computadorizada da densidade de cor do DNA dos esfregaços citológicos positivos e negativos para células neoplásicas malignas utilizando-se o método de Feulgen em relação aos índices do SCGR (técnica de Papanicolaou)

AMQC	Grau citológico qualitativo versus dados da avaliação quantitativa (Feulgen)		
	Grau I	Grau II	Grau III
Média	103,5	131,7*	98,4
Mediana	102,7	136,4	97,6
Desvio padrão	1,9	16,2	8,6
Mínimo	101,3	92,0	76,7
Máximo	106,8	157,5	111,9

AMQC: análise morfométrica quantitativa computadorizada.

Unidade: pixel.

Teste ANOVA, $p < 0,05$.

* Teste de comparação múltipla de Dunnett: $GII > GI$; $GIII > GII$.

colhida é definitivamente maligna, suspeita, definitivamente benigna ou se as células são insuficientes para um diagnóstico.

A partir dos estudos de Martin e Ellis, em 1930, a PAAF incrementou o diagnóstico citológico do câncer de mama, demonstrando ser uma técnica de fácil procedimento, de uso ambulatorial e baixo custo¹⁹.

Os parâmetros estabelecidos na graduação morfológica de carcinoma de mama são pleomorfismo nuclear, grau de diferenciação celular e contagem mitótica²⁰. O sistema de graduação citológica nuclear, proposto por Guilford e Robinson²¹, utiliza seis parâmetros (dissociação celular, tamanho nuclear, uniformidade nuclear, nucléolo, margem nuclear, cromatina) e três valores numéricos (um, dois e três), obtendo-se um escore parcial. O escore final é obtido por meio da somatória dos valores do escore parcial e designado como grau I, grau II e grau III. Sistemas que aplicam menor número de parâmetros dificultam a análise por restringirem as variáveis, e, por outro lado, aqueles que utilizam critérios baseados nas características nucleares apresentam maior concordância entre observadores, facilitando a utilização na rotina de forma rápida e segura.

Neste estudo, esfregaços obtidos por PAAF ou do raspado citológico (*imprint*) obtido por *core biopsy* mostraram-se adequados na coleta e coloração. A análise citológica foi estabelecida com facilidade e houve concordância em todos os casos com a avaliação histológica. Feoli *et al.*²², em 2008, concluíram que a experiência do avaliador aumenta significativamente a acurácia da citologia aspirativa da mama por agulha

fina e que esta técnica pode ser usada de modo complementar com a *core biopsy*.

Em 2008, Abdalla *et al.*², sugeriram que a morfometria nuclear computadorizada interativa é uma ferramenta eficiente e próspera para análise de amostras de mama colhidas por PAAF na distinção de lesões malignas das benignas da mama

Há uma concordância entre pesquisadores de que a imagem da citometria do DNA pelo método de Feulgen pode melhorar a precisão do diagnóstico citológico e auxiliar na distinção entre as lesões malignas e benignas da mama²³. A especificidade desta técnica, própria para análise estequiométrica ou quantificação do DNA de células normais ou tumores malignos^{24,25}, pode ser usada para avaliação do DNA de um grande número de células em um mesmo esfregaço²⁶, sendo aceito internacionalmente como marcador para neoplasia maligna e/ou pré-maligna²³.

Alguns estudos têm comparado o índice quantitativo de DNA com a graduação histológica e citológica em PAAF de câncer de mama^{27,13}. Em nosso estudo, a AMQC dos esfregaços citológicos negativos e positivos para células neoplásicas malignas mostrou que o método de Feulgen permitiu distinguir claramente as lesões benignas, do tipo fibroadenomas, das lesões malignas. Este mesmo resultado não foi possível quando relacionaram-se os resultados de ambos os métodos. Os resultados obtidos para os graus I e III foram muito próximos, porém, quando comparamos GI e GII ou GII e GIII, observamos diferenças significantes. No GI observamos homogeneidade no grau de compactação do DNA da cromatina e intensidade de cor heterogênea do DNA da cromatina enquanto no GIII, irregularidade na distribuição do DNA compactado, de forte intensidade, e frouxo de fraca intensidade. Por outro lado, GII apresentou grau de compactação do DNA da cromatina heterogênea e intensidade de cor heterogênea do DNA da cromatina. A grande variabilidade das características observadas no GIII resultou em dado numérico muito próximo ao do GI e distintamente diferente do GII, permitindo obter diferenças significantes quando comparados os grupos GI e GII ou grupo GII e GIII. A análise quantitativa do DNA pelo método de Feulgen teve resultados concordantes com os encontrados por outros autores, observando-se uma correlação positiva entre a graduação histológica e a área nuclear de espécimes citológicos^{28,29}.

Referências

1. Meijer GA, Beliën JA, van Diest PJ, Baak JP. Origins of image analysis in clinical pathology. *J Clin Pathol*. 1997;50(5):365-70.
2. Abdalla F, Boder J, Buhmeida A, Hashmi H, Elzagheid A, Collan Y. Nuclear morphometry in FNABs of breast disease in Libyans. *Anticancer Res*. 2008;28(6B):3985-9.
3. Jalava P, Kronqvist P, Smrzova B, Juntti-Patinen L, Kuopio T, Collan YU. Nuclear volume and breast cancer prognosis. *Anticancer Res*. 2001;21(1B):727-32.
4. Kazanowska B, Jelen M, Reich A, Tarnawski W, Chybicka A. The role of nuclear morphometry in prediction of prognosis for rhabdomyosarcoma in children. *Histopathology*. 2004;45(4):352-9.
5. Millot C, Dufer J. Clinical applications of cytometry to human tumor analysis. *Histol Histopathol*. 2000;15(4):1185-200.
6. Milord RA, Lecell K, Epstein JI. An objective morphologic parameter to aid in the diagnosis of flat urothelial carcinoma in situ. *Hum Pathol*. 2001;32(9):997-1002.

A literatura mostra que aproximadamente 25% das amostras de PAAF não podem ser classificadas definitivamente como benignas ou malignas, porém, em torno de 50 a 70% dessas amostras inclassificáveis são benignas, de acordo com os resultados das biópsias cirúrgicas. Há uma concordância geral de que a imagem citométrica do DNA pelo método de Feulgen pode melhorar a precisão do diagnóstico citológico e ajudar na distinção entre as lesões malignas e benignas da mama²³. Há mais de três décadas, discute-se na literatura a utilização da análise morfométrica quantitativa como ferramenta útil e de baixo custo, entretanto o emprego dessa técnica se mantém restrito a poucos centros de diagnóstico ou de pesquisa³⁰. Estudos mostram que a avaliação realizada por essa técnica pode fornecer informações clinicamente relevantes relacionadas ao grau de progressão e do potencial de malignidade do câncer de mama. Hoque *et al.*³¹ mostraram que a morfometria nuclear pode ser usada no prognóstico da recorrência do carcinoma ductal *in situ* após cirurgia e radiação, e Mommers *et al.*³² concluíram que a análise dos aspectos morfométricos da hiperplasia mamária pode fornecer melhoria significativa na avaliação do risco para o desenvolvimento do carcinoma.

Vários pesquisadores recomendam a análise de pelo menos cinco campos microscópicos em aumento de 400 vezes ou 1.000 vezes, aumentando o tempo para análise para minimizar as interpretações e as conclusões subjetivas às quais o olho humano possa conduzir, pois este é sensível a variáveis como luminosidade, diferenças de contraste e brilho^{4,6}. Isso torna a morfometria nuclear pouco factível de ser empregada. Polin *et al.*³³ sustentam que a morfometria nuclear fornece estrutura para uma padronização e reprodutibilidade para avaliação patológica quantitativa.

Concluímos, neste estudo, que a análise morfométrica nuclear dos aspirados de nódulo de mama é um método simples, confiável e complementar que permitiu distinguir as lesões benignas das lesões malignas da mama.

Agradecimentos

À professora doutora Helena Regina Comodo Segreto do Laboratório de Radiobiologia, Setor de Radioterapia da Escola Paulista de Medicina da Unifesp, pelas importantes sugestões para a composição deste estudo.

7. Lipponen P, Aaltomaa S, Papinaho S, Syrjänen K. Nucleolar organizer regions in myofibroblasts in breast cancer. Relation to cancer cell morphometry, flow cytometry, sex steroid receptor content, tumour histology and prognosis. *Pathol Res Pract*. 1993;189(9):1030-5.
8. Zajdela A, De Lariva LS, Ghossein NA. The relation of prognosis to the nuclear diameter of breast cancer cells obtained by cytologic aspiration. *Acta Cytol*. 1979;23(1):75-80.
9. Bandlish U, Kapoor K, Shukla S. Efficacy of a modified ultrafast Papanicolaou (UFP) stain for breast aspirates. *J Indian Med Assoc*. 2004;102(6):309;312;326.
10. Hunt CM, Ellis IO, Elston CW, Locker A, Pearson D, Blamey RW. Cytological grading of breast carcinoma—a feasible proposition? *Cytopathology*. 1990;1(5):287-95.
11. Sneige N. Nuclear grading in fine needle aspirates of the breast. *Cytopathol Annu*. 1992;15(2):161-71.
12. Chieco P, Derenzini M. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol*. 1999;111(5):345-58.
13. Yildirim-Assaf S, Coumbos A, Hopfenmüller W, Foss HD, Stein H, Kühn W. The prognostic significance of determining DNA content in breast cancer by DNA image cytometry: the role of high grade aneuploidy in node negative breast cancer. *J Clin Pathol*. 2007;60(6):649-55.
14. Kiernan JA. *Histological & histochemical methods: theory and practice*. New York: Oxford University Press; 2001; p. 502.
15. Pearse AGE. *Histochemistry: theoretical and applied*. Boston: Little, Brown & Company; 1986.
16. Papanicolaou GN. A new procedure for staining vaginal smears. *Science*. 1942;95(2469):438-9.
17. Davey DD, Banks ER, Jennings D, Powell DE. Comparison of nuclear grade and DNA cytometry in breast carcinoma aspirates to histologic grade in excised cancers. *Am J Clin Pathol*. 1993;99(6):708-13.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Mamografia: da prática ao controle*. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA 2007; p. 109-1.
19. Martin HE, Ellis EB. Biopsy by needle puncture and aspiration. *Ann Surg*. 1930;92(2):169-81.
20. Howell LP, Gandour-Edwards R, O'Sullivan D. Application of the Scarff-Bloom-Richardson tumor grading system to fine-needle aspirates of the breast. *Am J Clin Pathol*. 1994;101(3):262-5.
21. Robinson IA, McKee G, Nicholson A, D'Arcy J, Jackson PA, Cook MG, et al. Prognostic value of cytological grading of fine-needle aspirates from breast carcinomas. *Lancet*. 1994;343(8903):947-9.
22. Feoli F, Paesmans M, Van Eeckhout P. Fine needle aspiration cytology of the breast: impact of experience on accuracy, using standardized cytologic criteria. *Acta Cytol*. 2008;52(2):145-51.
23. Elzagheid A, Kuopio T, Collan Y. Implementation of DNA cytometric measurements in fine-needle aspiration biopsy diagnostics of breast disease. *Cancer*. 2004;102(6):380-8.
24. Remmerbach TW, Hemprich A, Böcking A. Minimally invasive brush-biopsy: innovative method for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2007;117(9):926-40.
25. Veltri RW, Miller MC, Isharwal S, Marlow C, Makarov DV, Partin AW. Prediction of prostate-specific antigen recurrence in men with long-term follow-up postprostatectomy using quantitative nuclear morphometry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(1):102-10.
26. Pektas ZO, Keskin A, Günhan O, Karslıoğlu Y. Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006;64(4):628-35.
27. Dantas K, Santos GC, Giannotto Filho O. Sistemas de graduação para carcinoma de mama: estudo comparativo da concordância cito-histológica. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2003;25(2):87-94.
28. Martin HE, Ellis EB. Biopsy by needle puncture and aspiration. *Ann Surg*. 1930;92(2):169-81.
29. Sarker S, Spigelman A, Walker M, Coleman D. Nuclear DNA content of fine needle aspirates of invasive ductal carcinomas of the breast. *Anal Cell Pathol*. 1997;13(1):1-8.
30. Andrea CE, Bleggi-Torres LF, Alves MTS. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. *J Bras Patol Med Lab*. 2008;44(1):51-7.
31. Hoque A, Lippman SM, Boiko IV, Atkinson EN, Sneige N, Sahin A, et al. Quantitative nuclear morphometry by image analysis for prediction of recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(3):249-59.
32. Mommers EC, Page DL, Dupont WD, Schuyler P, Leonhart AM, Baak JP, et al. Prognostic value of morphometry in patients with normal breast tissue or usual ductal hyperplasia of the breast. *Int J Cancer*. 2001;95(5):282-5.
33. Poulin N, Frost A, Carraro A, Mommers E, Guillaud M, Van Diest PJ, et al. Risk biomarker assessment for breast cancer progression: replication precision of nuclear morphometry. *Anal Cell Pathol*. 2003;25(3):129-38.